4163

MYCOPATHOLOGIA

EDITORES:

R. CIFERRI et P. REDAELLI

Pavia **Milano**

COLLABORATORES:

F. de Almeida, Sao Paulo — A. E. de Area Leao, Rio de Janeiro — R. Arima, Osaka — A. Azzi, Torino — I. Ballagi, Budapest — T. Benedek, Chicago — R. W. Benham, New York — K. B. Boedijn, Buitenzorg — A. Buschke, Berlin — A. Carini, Sao Paulo — A. L. Carrión, San Juan de Puerto Rico — A. Castellani, Roma — A. Catanei, Alger — N. F. Conant, Durham, N. C. — J. N. Couch, Chapel Hill, N. C. — E. D. Delamater, New York — C. W. Dodge, St. Louis, Mo. — C. W. Emmons, Washington, D. C. — G. Enderlein, Berlin — W. Engelhardt, Tübingen — G. Falchi, Pavia — A. da Fonseca, Rio de Janeiro — I. Froilano de Mello, Nova Goa (Indes Portugaises) — J. A. Gammel, Cleveland, Ohio — H. Gougerot, Paris — L. Grigoraki, Marseille — A. Guilliermond, Paris (†) — F. C. Harrison, Montreal — A. T. Henrici, Minneapolis Minn. (†) — J. G. Hopkins, New York — R. St. John-Brooks, London — T. Kambayashi, Tokyo — J. E. McKinnon, Montevideo — O. de Magalhâes, Bello Horizonte — A. v. Mallinkrodt-Haupt, Köln — D. S. Martin, Durham, N. C. — S. Milochevitch, Beograd — M. Moore, St. Louis, Mo. — J. A. Nannfeldt, Upsala — P. Negroni, Buenos Aires — Walter I. Nickerson, Norton, Mass — F. L. N. Nino, Buenos Aires — T. Ørskov, København — M. Ota, Tokyo — Pereira Filho, Porto Alegre — A. Pijper, Pretoria — G. Pollacci, Pavia — V. Puntoni, Roma — I. Ramsbottom, London — E. Rixford (†), San Francisco, Calif. — H. da Rocha Lima, Sao Paulo — A. Sartory, Paris — R. Sartory, Strasbourg — F. J. Seaver, New York — R. V. Talice, Montevideo — F. W. Tanner, Urbana, Ill. — Ch. Thorn, Washington, D.C. — A. C. Ukil, Calcutta — I. Ch. Verbunt, Batavia — O. Verona, Pisa — S. A. Waksman, New Brunswick, N. J. — F. D. Weidmann, Philadelphia, Pa. — J. Westerdijk, Baarn.

VOLUMEN IV

UITGEVERIJ Dr. W. JUNK — DEN HAAG — 1947-1949

VOLUMEN IV

Fasc. 1 edit.: 30. VIII. 1947
Fasc. 2 edit.: 30. I. 1948
Fasc. 3 edit.: 30. IX 1948
Fasc. 4 edit.: 30. VIII. 1949

Copyright 1949 by Uitgeverij Dr. W. Junk
The Hague

Printed in the Netherlands

CONTENTS: CONTENUTO: INHALT: TABLE DES MATIÈRES:

Pag.

C. Cavallero: L'allergia e l'immunità nelle micosi. 5°: Allergia nelle malattie a presunta eziologia micosica. Malattie allergiche da funghi. Considerazioni generali e conclusioni *(dallo Istituto di Anatomia patologica, Università di Pavia)* . . 1

P. Redaelli e **R. Ciferri:** Un quadriennio di attività del Centro di Micologia umana e comparata di Pavia (1938-1941) *(dal Centro di Micologia umana e comparata di Pavia)* 25

O. Verona: Sulla presenza e numero degli Actinomiceti nel terreno agrario in rapporto alle diverse stagioni dell'anno *(dall'Istituto di Microbiologia Agraria, Università di Pisa)* 48

R. Ciferri e **P. Redaelli:** Reisolamento del *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm. e proposta del cambiamento del nome generico di *Mycoderma* Leberle in *Mycokluyveria* nobis. *(Centro di Micologia umana e comparata, Pavia)* 54

E. Baldacci: Die Systematik der Actinomyceten *(Orto Botanico* e *Laboratorio Crittogamico, Università di Pavia)* 60

E. Borghese: Il ciclo del batterio simbionte di *Blattella germanica* (L.) *(Istituto di Anatomia umana normale, Università di Pavia)* 85

Charles H. Drake: The pathogenicity of *Aspergillus nidulans (Department of Bacteriol. a. Public Health, State College of Washington, Pullman, Washington)* 103

Charles H. Drake: Arthur Trautwein Henrici (1889-1943) 120

O. Verona: Alexandre Guilliermond *(Istituto di Microbiologica agraria, Università di Pisa)* 124

R. Ciferri e **P. Redaelli:** Mancata formazione di forme ascofore e conservazione di culture di funghi patogeni in substrati naturali. *(Centro di Micologia umana e comparata), Milano-Pavia)* 131

R. **Ciferri** e **P. Redaelli:** *Torula Morrhuae*, another synonim of *Sporendonema epizoum* (Corda) Cif. et Red. *(Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia)* 137

F. Serri: Ricerche sul potere fungistatico e fungicida del sangue nelle dermatomicosi *(Clinica Dermosifilopatica, Università di Pavia)* 139

L. Farina: Ricerche sul decorso delle infezioni sperimentali da dermatofiti in rapporto ad un eventuale stato di iperrecettività provocata *(Clinica Dermosifilopatica, Università di Pavia)* 162

A. Giardini e **F. Serri:** Potere patogeno dei dermatomiceti sull'occhio *(Clinica Oculistica* e *Clinica Dermosifilopatica, Univ. di Pavia)* 172

P. Cipriani: Comportamento dei Blastomiceti di fronte al metodo di colorazione proposto da Dold *(Istituto di Microbiologia argraria e tecnica, Università di Firenze)* 187

Bibliographia Mycopathologica, 1942-1944 190

T. Benedek: On the newer trend of Classification of Dermatophytes *(Research Laboratory, Salvation Army Clinics, Chicago)* 201

G. Magni: Biological significance of the pseudomycelium in asporogenous yeasts. I. Reciprocical inhibition of parallel colonies. *(Centro di Micologia umana e Comparata, Milano-Pavia)* 210

G. Magni and **A. Villa:** Antibiotic substances and control of gramnegative microrganisms: Activity of *Penicillium chloroleucon (Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia)* 213

R. Ciferri: Attività antibiotica di alcuni dermatofiti *(Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia)* 219

P. Pinetti: Studi sulla biologia dei dermatomiceti. II°: Capacità di assimilazione degli idrati di carbonio ed attività fermentative glicolitiche di alcuni dermatomiceti. *(Clinica Dermosiflopatica, Università di Cagliari)* 222

F. Flarer e **G. Mezzadra:** Studio clinico-sperimentale dell'allergia. I°: Dimostrazione di fattori flogogeni nella cute normale di ammalati di tricofizia granulomatosa. *(Clinica Dermosifilopatica, Università di Padova)* 235

R. Ciferri e **O. Verona:** Chiavi analitiche dei lieviti segnalati nelle uve, nei mosti e nei vini. *(Istituto Botanico, Università di Pavia e Istituto di Microbologia agraria, Università di Firenze)* 243

R. Ciferri, O. Verona e **F. Luparini:** Segnalazione e descrizione dei lieviti nelle „acque di vegetazione" delle olive. *(Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia)* 249

Pag.

M. Giovannozzi: Microflora blastomicetica dei tabacchi. *(Sezione di Zimologia, Istituto scientifico sperimentale per i Tabacchi, Scafati, Italia)* 260

O. Verona e G. Florenzano: Sopra alcuni aspetti morfologici di *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch. *Istituto di microbiologia agraria, Università di Firenze)* 268

M. Moore: Granulomatous moniliasis resembling Blastomycosis (Gilchrist's Disease) *(Department of Dermatology, Barnard Free Skin and Cancer Hospital, St. Louis, Missouri)* 272

W. J. Nickerson and O. F. Jillson: Interaction between pathogenic Fungi in culture. Considerations on the mechanism of cell division in the dimorphism of pathogenic Fungi. *(Tufts College, Medical School, Boston, Mass.)* 279

Bibliographia Mycopathologica, 1946-1947 284

P. Negroni: Estudios sobre el *Coccidioides immitis* (Stiles). I°. Micelio vegetativo y de fructificación. *(Instituto Bacteriológico „Malbran", Buenos Aires)* . . . 315

P. Negroni: Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist. II. Estudio micológico de las cepas autoctonas y revisión del granuloma coccidioidal en la Argentina. *(Instituto Bacteriológico „Malbran", Buenos Aires)* 321

P. Negroni y C. A. N. Daglio: Satelitismo microbiano: *Actinomyces Israeli-Streptococcus* sp. *(Instituto Bacteriológico „Malbran", Buenos Aires)* 327

P. Negroni y C. A. N. Daglio: Hongos blastosporados de los esputos. *(Instituto Bacteriológico „Malbran", Buenos Aires)* 330

M. G. Ronzoni: Funghi lievitiformi isolati dalle ovoteche di *Periplaneta orientalis* L. *(Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia)* 333

Milton Thiago de Mello: Rhinosporidiosis *(Osvaldo Cruz Institute, and Army Veterinary School, Rio de Janeiro)* 342

V. M. Schwarting and C. E. Skinner: Candida in sputum of patients with tuberculosis. *(Glen Lake Sanatorium, Oak Terrace, Minn.,* and *Depart. of Bacteriol. and Immunol., University of Minnesota, Minneapolis, Minn. U.S.A.)* 349

R. C. Artagaveytia-Allende y L. Montemayor: Estudio comparativo de varias cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* y especies afines. *(Instituto de Higiene de Montevideo y de la Universidad Central de Caracas)* 356

J. E. Mackinnon: The Dependence on the weather of the incidency of Sporotrichosis. *(Instituto de Higiene esperimental, Montevideo)* 367

R. C. Artagaveytia-Allende: Estudio de algunas propriedades biológicas de varias cepas de *Coccidioides immitis* (Stiles) *(Instituto de Higiene, Montevideo)* . . 375

L. de Montemayor: Estudio de las propiedades biológicas de varias cepas de hongos patógenos causantes de la Cromomicosis, y de especies vecinas saprofitas y patógenas. *(Departamento de Parasitologia, Instituto de Higiene, Montevideo)* 379

J. E. Mackinnon, L. V. Ferrada-Urzüa and L. Montemayor: *Madurella grisea* n. sp.: a new species of fungus producing the black variety of Maduromycosis in South America. *(Instituto de Igiene experimental, Montevideo)* 384

A. St. v. Mallinkrodt-Haupt: Einfluss von Vitaminen auf die Pilzkultur. *(Universität's Hautklinik, Köln)* 394

BIBLIOGRAPHIA MYCOPATHOLOGICA

1942-1944 (30. I. 1948) 190
1946-1947 (30. IX. 1948) 284

PLATES: TAVOLE: PLANCHES: TAFELN:

		Pag.
Tab. I—III.	**E. Borghese**, Il ciclo del batterio simbionte di *Blattella germanica* (L.)	92
Tab. IV.	**Charles H. Drake**, Pathogenicity of *Aspergillus nidulans*	114
Tab. V.	**Charles H. Drake**, Arthur Trautwein Henrici	120
Tab. VI—VII.	**G. Magni**, Biological significance of the pseudomycelium in asporogenous yeasts	212
Tab. VIII.	**Ciferri R., O. Verona** e **F. Luparini**, Segnalazione e descrizione di lieviti nelle „acque di vegetazione" delle olive	258
Tab. IX.	**M. Giovannozzi**, Microflora blastomicetica dei tabacchi	262
Tab. X—XIII.	**M. Moore**, Granulomatous Moniliasis resembling Blastomycosis (Gilchrist's Disease)	278
Tab. XIV.	**W. J. Nickerson** and **O. F. Jillson**, Interaction between pathogenic fungi in culture. Considerations on the mechanism of cell division in the dimorphism of pathogenic fungi	282
Tab. XV.	**P. Negroni**, Estudios sobre el *Coccidoides immitis* (Stiles). I° Micelio vegetativo y de fructificación	320
Tab. XVI.	**P. Negroni**, Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist. II° Estudio micológico de las cepas autoctonas y revisión del granuloma coccidioidal en la Argentina	326
Tab. XVII.	**P. Negroni** y **C. A. N. Daglio**, Satelitismo microbiano: *Actinomyces Israeli-Streptococcus* sp.	328
Tab. XVIII.	**Milton Thiago de Mello**, Rhinosporidiosis	348
Tab. XIX—XX.	**R. C. Artagaveytia-Allende** y **L. de Montemayor**, Estudio comparativo de varias cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* y especies afines	366
Tab. XXI.	**R. C. Artagaveytia-Allende**, Estudio de algunas propiedades biológicas de varias cepas de *Coccidioides immitis* (Stiles)	376
Tab. XXII.	**J. E. Mackinnon, L. V. Ferrada-Urzüa** and **L. de Montemayor**, *Madurella grisea* n. sp.: a new species of fungus producing the black variety of Maduromycosis in South America	392

31 text illustrations.

Index Autorum

ARTAGAVEYTIA-ALLENDE R.C., 356, 375.
BALDACCI E., 60.
BENEDEK T., 201.
BORGHESE E., 85.
CAVALLERO C., 1.
CIFERRI R., 25, 54, 131, 137, 219, 243, 249.
CIPRIANI P., 187.
DAGLIO C. A. N., 327, 330.
DRAKE CH. H., 103, 120.
FARINA L., 162.
FERRADA-URZÚA L.V., 384.
FLARER F., 235.
FLORENZANO G., 268.
GIARDINI A., 172.
GIOVANNOZZI M., 260.
JILLSON O. F., 279.
LUPARINI F., 249.
MACKINNON J. E., 367, 384.
MAGNI G., 210, 213.
MALLINKRODT-HAUPT A. St. v., 394.
MEZZADRA G., 235.
MONTEMAYOR L., 356, 379, 384.
MOORE, M., 272.
NEGRONI P., 315, 321, 327, 330.
NICKERSON W. J., 279.
PINETTI P., 222.
REDAELLI P., 25, 54, 131, 137.
RONZONI M. G., 333.
SCHWARTING V. M., 349.
SERRI F., 139, 172.
SKINNER C. E., 349.
THIAGO DE MELLO M., 342.
VERONA O., 48, 124, 243, 249, 268.
VILLA A., 213.

L'allergia e l'immunità nelle micosi

5°: Allergia nelle malattie a presunta eziologia micosica. Malattie allergiche da funghi. Considerazioni generali e conclusioni.

del

Dr. Cesare Cavallero

(*dall'Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica, R. Università di Pavia*)

(1.V.1941.)

Allergia nelle malattie a presunta eziologia micosica

Dermatite seborroica.

Si ritiene da alcuni che l'agente eziologico della *dermatite seborroica*, già descritto evasivamente da Malassez col nome di „spore" e da Unna col nome di „Flaschen-bazille" sia un lievito asporigeno, cui si è convenuto di dare il binomio di *Pityrosporon ovale*. Le colonie di questo fungo messe in contatto della cute normale non producono in genere alcuna lesione; solo per iniezione intradermica o, meglio, per innesto cutaneo previa scarificazione, in alcuni casi si possono riprodurre artificialmente le tipiche lesioni dermatitiche, specie poi se l'innesto si fa su cute seborroica anzichè su cute secca o normale (Cleveland White).

Moore e collaboratori (1935—36) hanno ricercato le reazioni allergiche degli ammalati di dermatite seborroica verso i filtrati e gli estratti colturali del *Pityrosporon*; la ricerca è stata condotta su 18 pazienti, in parte con *seborrhea capitis simplex*, in parte con *seborrhea corporis*. Le „pitirosporine" sono state preparate in diverso modo: „A" è il filtrato delle colture del fungo (esotossina?); „B" è un estratto fungino ricavato per triturazione in mortaio delle cellule fungine (endotossina?); „C" è una mescolanza a parti uguali delle pitirosporine „A" e „B"; „D" è un estratto preparato secondo la tecnica dettata da Muskatblit e Director per la preparazione della tricofitina; e infine „E" è un estratto preparato secondo il metodo di preparazione della „AT". I risultati complessivi della ricerca sono riportati dagli autori nella tabella che segue:

Pitirosporina	Aspetto della reazione intradermica		
	Positivo	Negativo [1])	Totale
„A"	1	17	18
„B"	11	7	18
„C"	5	13	18
„D"	6	12	18
„E"	0	3	3

[1]) In 3 dei 18 casi presi in esame la prova è risultata negativa con tutti 5 gli antigeni in studio.

L'insieme di questi risultati ci pare ben poco persuasivo per convalidare la natura micosica della dermatite seborroica; sia per lo scarso materiale clinico preso in esame, sia anche perchè, non essendo state fatte prove di controllo su persone sane, noi non possiamo escludere che parte delle reazioni positive siano state causate da un'azione tossica primaria dei derivati fungini. Ricordiamo che nella dermatite seborroica le lesioni, se anche si estendono ad ampi tratti di cute, rimangono pur sempre molto superficiali, e, anche ammesso che il fungo sia il vero agente sostenitore della malattia, esso è presente solo negli strati più superficiali dell'epidermide. E giustamente Moore trascura i risultati delle sue prove allergiche nelle conclusioni del suo lavoro; egli trova infatti in altri elementi, e soprattutto nelle brillanti e fortunate prove di riproduzione sperimentale della malattia, la miglior convalida della natura micosica dell'affezione.

Benedek (1928), fondandosi su ricerche estese ad oltre 600 casi, è stato indotto a ritenere agente della dermatite seborroica il suo *Schizosaccharomyces hominis*; questo sarebbe l'agente causale di altre numerose e svariate affezioni cutanee, quali la *pitiriasis capitis*, l'*alopecia pityroides* e la *calvizie*, la *pitiriasi della faccia*, l'*acne volgare* o *giovanile*, l'*acne rosacea* etc. Benedek ha isolato questo germe anche dal circolo sanguigno, il che lo ha indotto a ritenere che esso sia capace di dare lesioni tanto per innesto diretto sulla cute normale, che indirettamente per via ematica sulla cute previamente sensibilizzata: si avrebbero quindi due tipi distinti di affezione, la „schizosaccaromicosi" e la „schizosaccaromicide". Benedek (1929) afferma di aver ottenuto risultati positivi nelle prove di innesto del fungo sulla cute dell'uomo e dell'animale; anche le prove immun-biologiche si son dimostrate favorevoli alle sue concezioni. Mentre queste starebbero a dimostrare la formazione di anticorpi specifici umorali, le reazioni cutanee allergiche starebbero a rappresentare la formazione di anticorpi istogeni pure specifici.

Le ricerche di contollo eseguite da numerosi ricercatori non hanno però confermato questi risultati e anche Benedek stesso attualmente ritiene che il parassita da lui studiato sia in realtà un batterio e precisamente il *Bact. megatherium* Du Bary, il quale si ritrova come endosaprofita innocuo e costante nell'uomo. Bernstein (1930) ha controllato le ricerche di Benedek sulla dermatite seborroica e sulla pitiriasi; su 20 casi di pitiriasi e su 23 di pitiriasi associata ad eczema seborroico del corpo, da nessuno ha mai potuto isolare il germe di Benedek, e in 25 di questi pazienti anche lo studio dell'allergia non ha dato alcun risultato.

Erisipeloide.

L'erisipeloide è una malattia che interessa soprattutto la patologia veterinaria; è noto però, dopo la classica dimostrazione datane da Rosenbach, che essa può colpire anche l'uomo. Alcuni Autori seguono ancora l'opinione di Vuillemin che classificava l'agente specifico della malattia nel gruppo degli actinomiceti col nome di *Actinomyces thuillieri*; lo stesso fungo sarebbe l'agente eziologico del mal rossino del maiale. Esso d'altra parte dimostra azioni biologiche molto lontane da quelle che noi siamo soliti ad osservare per un fungo del gruppo degli actinomiceti: cosi è noto ad esempio che l'erisipeloide lascia dietro di sè un'immunità duratura e completa, fatto che non è invece ancora dimostrato per le malattie da actinomiceti. Pur non avendo idee personali in proposito, se l'agente dell'erisipeloide debba entrare nel gruppo degli actinomiceti, o non piuttosto, come i più ritengono, sia da considerare uno schizomicete, noi riassumiamo qui alcune notizie sui fenomeni allergici di questa malattia, tenendo presente che attualmente vi sono autori ancora convinti della natura fungina della malattia.

Jadassohn e Ju-Wu-Mu (1931) in uno studio sperimentale sull'immunità nell'erisi-

peloide hanno potuto fare alcuni interessanti rilievi. Negli animali reinoculati essi hanno notato che la reazione locale assume caratteri diversi da quelli della lesione primaria: l'estensione assunta dalla lesione seconda sarebbe infatti minore e l'infiltrazione invece maggiore di quella che si produce con una prima inoculazione. L'iniezione intracutanea di un'emulsione di germi uccisi al calore in conigli normali non determina che scarsi fatti reattivi passeggeri, mentre nei conigli già infetti si ha una reazione molto intensa, presentante tutti i caratteri di una reinfezione da germi vivi.

Balbi (1931), dallo studio clinico ed anatomo-patologico di 5 casi di erisipeloide, è giunto alla conclusione che l'agente della malattia sia uno schizomicete e che esso sia lo stesso agente sostenitore del mal rossino; la controversia esistente su quest'ultimo punto sarebbe da Balbi risolta nel senso che le due malattie non sarebbero sostenute da germi appartenenti a due razze affini, come dai più si riteneva in passato, ma nel senso che lo stesso germe assumerebbe differenze di attività e comportamento a seconda degli individui, dando così forme cliniche diverse. Studiando i fenomeni allergici osservabili nell'uomo e nell'animale infetto o guarito da questa malattia, Balbi ha dimostrato che l'iniezione intradermica di „erisipeloidina" dà in ogni caso risultato positivo; la stato allergico cutaneo anzi si stabilirebbe in questi malati molto precocemente donde una sua eventuale utilizzazione a scopo diagnostico.

Eczema.

Per Ravaut l'*eczema*, qualunque ne sia la varietà in esame, rappresenta sempre una reazione seconda di natura allergica che per manifestarsi necessita di due fattori: un antigene esogeno od endogeno sensibilizzante e scatenante ed un terreno speciale organico. Sul secondo punto noi ben poco sappiamo; sul primo punto le recerche di Ravaut e dei suoi numerosi collaboratori hanno dimostrato che l'agente scatenante della forma eczematosa può essere molto vario. Noi non abbiamo elementi per discutere la teoria allergica dell'eczema, nè vogliamo entrare in questa discussa questione; ci basterà di accennare brevemente ad essa con particolare riguardo all'importanza che secondo le ricerche di Ravaut e della sua Scuola deve essere attribuita ai funghi lieviti ed ai dermatofiti nella sua eziologia. Per evitare inutili ripetizioni rimandiamo il lettore al capitolo dedicato ai lieviti, dove abbiamo considerato la questione in dettaglio e dove abbiamo riportato per esteso le ricerche di Ravaut e della sua Scuola; ci limitiamo qui a ricordare che per Ravaut le „levuridi" costituiscono una varietà di eczema secondo, che deve entrare nell'ampio gruppo degli eczemi allergici. Ravaut con l'insieme dei suoi lavori ha dimostrato in definitiva che in soggetti sensibilizzati in precedenza da lesioni da lieviti o da streptococchi o dall'associazione non infrequente di questi due fattori possono comparire in regioni lontane, sotto forma eruttiva, delle manifestazioni secondarie sterili, *di tipo eczematoso e di natura allergica.* A convalidare in alcuni casi la natura allergica micosica e la patogenesi tossinica, egli è riuscito a riprodurle mediante l'iniezione nella cute della sola tossina; anzi egli ha constatato che in alcuni casi questi individui già sensibilizzati per un colpo anteriore conservano, anche per un tempo molto lungo e senza dare alcuna manifestazione tangibile esterna, la loro facoltà di reagire ulteriormente in presenza dell'antigene specifico.

Jausion, Lenègre e Vendel avevano anch'essi avanzato fin dal 1928 l'ipotesi di un meccanismo antigene comune alle piococcíe ed alle micosi nell'eziologia dell'eczema e nel 1929 affermavano l'esistenza di una sensibilizzazione antigenica negli eczemi micosici: e già nel 1932 Jausion e collaboratori guarivano gli eczemi e la paracheratosi postmicosiche con i loro „clasovaccini" e con le „clasine micosiche polivalenti".

Questi sono i fatti meglio noti e le riprove più soddisfacenti che la letteratura ci offre nei riguardi dell'eczema micosico allergico; ed è da essi che sono derivati sotto l'impulso degli autori delle scuole dermatologiche francesi tutti quegli studi tendenti a dimostrare l'importanza diretta od indiretta dell'infezione fungina nell'eziologia di svariate affezioni cutanee ad eziopatogenesi finora ignota o poco nota.

Da alcuni autori americani si sostiene che anche nell'*eczema infantile*, forma clinica a sè stante e ben caratterizzata, ma ad eziologia tuttora ignota, l'infezione micosica giuochi un ruolo non trascurabile. Ricordiamo che White Cleveland (1928), ad avvalorare questa tesi, su 32 casi di eczema infantile ha isolato in una percentuale del 77% dei funghi lievitiformi e che molti altri autori hanno avuto reperti analoghi.

Nei lavori di questi autori si è spesso trascurata l'esatta definizione botanica del fungo; ora il fungo isolato viene ascritto al gruppo della *Monilia albicans*, ora viene descritto evasivamente come un *Cryptococcus*, ora infine viene ascritto al gruppo dei dermatofiti; nè gli autori decidono se tali funghi vadano considerati come saprofiti innocui della cute o non piuttosto come veri agenti sostenitori della forma morbosa.

Le ricerche condotte da Hill (1934) sulla sensibilità agli estratti fungini dei bambini affetti da eczema hanno cercato di risolvere quest'ultima questione. Hill pratica reazioni intracutanee in questi pazienti con un estratto di un lievito, la „oidiomicina Lederle", diluita a 1/100 preparata da un ceppo patogeno di *Monilia albicans*, e con la „tricofitina Metz", un estratto preparato da diversi ceppi di *Trichophyton*. Con l'oidiomicina, su 100 pazienti considerati, in 15 (15%) ottiene una reazione positiva, spesso anche molto intensa; 3 di questi avevano 1 anno, 3 avevano da 1 a 2 anni e 9 erano di età superiore ai 2 anni. Con la tricofitina su 60 pazienti presi in considerazione si sono avute soltanto 2 reazioni positive e per di più dubbie. 30 bambini sani di controllo di età tra 2 e 12 anni, saggiati nella loro sensibilità verso l'allergene oidiomicetico, hanno dato solo 2 reazioni fortemente positive e 3 reazioni deboli (8% di reazioni positive).

Hill sulla base di questi risultati si crede autorizzato a concludere che nell'eczema infantile l'infezione da lieviti asporigeni abbia una certa importanza; nessuna o ben scarsa importanza avrebbe invece al riguardo l'infezione tricofitica.

Psoriasi.

Non è qui il luogo di discutere le varie teorie che sono state affacciate sull'eziologia della *psoriasi*. Ci basti ricordare che vi sono autori che vedono in questa malattia l'espressione di un disturbo metabolico, mentre altri invece pensano piuttosto a una sua genesi parassitaria. Molti e svariati organismi sono stati descritti come agenti della psoriasi, nè si è giunti ancora ad un accordo completo sull'argomento.

Recenti osservazioni di autori americani e francesi tendono a dare all'infezione fungina un'importanza fondamentale nell'eziologia della malattia.

Fleischer e Wachowiak in un primo lavoro comparso nel 1925 segnalavano come frequentemente gli psoriasici albergano dei lieviti asporigeni nelle feci, nel sangue e sulla cute; su 24 casi di psoriasi, si trovò che l'83% albergava funghi lievito nel tubo intestinale, il 21% nel sangue ed il 46% sulla cute. In una seconda nota comparsa nel 1929 gli stessi autori in collaborazione con Marr e Bock esaminavano altri 32 pazienti ed ottenevano le percentuali seguenti: risultati positivi dalle feci nel 90%, dal sangue nel 10% e dalla cute nel 29% dei casi.

Questi valori debbono essere ritenuti molto elevati; i reperti di funghi di tipo lievito sulla cute, nel sangue e nelle feci di individui normali raggiungono infatti cifre molto più esigue. Nelle feci di individui normali la percentuale di casi positivi è fissata da Ash-

FORD sulla cifra del 3% e da DOLD sulla cifra del 7,5%, da WACHOWIAK e collaboratori sul 6%. Sulla cute normale il reperto di tali funghi lieviti sarebbe secondo WACHOWIAK sempre negativo. Dal sangue poi, salvo particolari condizioni morbose, il reperto è del pari sempre negativo.

Stabilito questo confronto, FLEISCHER e WACHOWIAK si sono creduti autorizzati ad ammettere un certo rapporto tra i lieviti asporigeni e la psoriasi, ed a convalidare la loro ipotesi hanno istituito nei pazienti alcune prove. In primo luogo è stata saggiata la reattività cutanea di 40 psoriasici verso un allergene costituito da colture del fungo ucciso al calore, il quale nelle prove di controllo preliminari su 35 soggetti sani e non psoriasici aveva dato una percentuale di positività del 43%; la prova negli psoriasici ha avuto esito positivo nel 100% dei casi. In secondo luogo è stata saggiata in 38 pazienti l'azione terapeutica di uno stock vaccino preparato col fungo; nel 26% dei casi trattati si è avuto un netto miglioramento, e nel 42% dei casi solo un lieve o nessun miglioramento.

I tentativi di riprodurre la forma psoriasica nell'animale da esperimento mediante l'applicazione sulla cute di colture del fungo sono fallite, però essi hanno valso a dimostrare che il fungo è dotato di una certa azione patogena.

Dall'insieme di questi fatti, criticamente vagliati per quel che si riferisce ai risultati negativi, FLEISCHER e WACHOWIAK sono giunti alla conclusione che indubbiamente funghi del tipo dei lieviti asporigeni giuochino un ruolo di primo piano nell'affezione.

Nel loro primo lavoro sull'argomento essi pensavano che il micete agisse sensibilizzando la cute in tutta la sua estensione, sia come tale, sia per mezzo dei suoi prodotti riassorbiti attraverso la mucosa intestinale, e che la lesione cutanea fosse il risultato di un impianto del micete sulla cute previamente sensibilizzata. Nel secondo lavoro essi limitano alquanto questa loro prima concezione: essi pensano infatti che il fungo possa anche rappresentare non il fattore primo della malattia, ma un fattore secondario che si somma al vero agente causale della malattia e che concorre a mantenere la cronicità del processo. Il fattore causale vero della psoriasi è o un disturbo costituzionale metabolico endocrino, o un disturbo infettivo da germe ancora ignoto; queste cause vere della psoriasi possono verosimilmente creare delle particolari condizioni dell'organismo e dell'intestino favorevoli all'insediarsi dei lieviti nel tubo intestinale e sulla cute dove questi persistendo come ospiti abituali agirebbero in modo nocivo sul decorso della malattia.

JAUSION e collaboratori a insaputa dei reperti di WACHOWIAK, hanno portato della psoriasi una interpretazione analoga. Seguendo la via tracciata da RAVAUT, il quale sulla base di osservazioni istopatologiche aveva già formulato per gli studiosi una ipotesi di lavoro che valesse a dimostrare per la psoriasi l'esistenza di movimenti allergici, questi AA. sono giunti a risultati molto incoraggianti che riferiremo dettagliatamente. JAUSION e SOLEIL, PECKER, PAGÈS e GERVAIS comunicavano alla Società francese di Dermatologia in una seduta del gennaio 1932 i primi risultati soddisfacenti avuti dallo studio di soggetti psoriasici con il „test" cutaneo tricofitinico e con la prova terapeutica micovaccinale. Questi AA. hanno molto curato la preparazione dell'allergene e del vaccino allo scopo di evitare le false reazioni dovute al contenuto proteico degli estratti ed hanno dato una formula di preparazione che mette sempre al riparo da questi inconvenienti e che permette quindi di trarre conclusioni sicure ed insindacabili. I dati complessivi che gli autori hanno tratto dal loro studio sulla reattività cutanea degli psoriasici sono stati i seguenti:

1) va segnalato in primo luogo che di 54 psoriasici presi in considerazione ben 37, e quindi una percentuale del 68%, erano portatori di una epidermofizia inguinale o di intertrigini micosiche o ancora di altre affezioni fungine;

2) dei 54 pazienti 44 (80%) hanno reagito con reazioni molto spiccate ed evidenti

alla prova intradermica con un allergene micosico polivalente preparato secondo un metodo particolare; 28 hanno contemporaneamente reagito alla tricofitina standard, 2 alla tricofitina pura, 10 all'epidermofitina, 3 alla microsporina ed 1 non ha reagito che all'allergene streptococcico. Va aggiunto che 8 dei pazienti hanno presentato un effetto isomorfo molto caratteristico, che 5 di essi dopo un prolungato trattamento micovaccinale sono diventati tricofitino-negativi, e che in alcuni in seguito alla iniezione intradermica del filtrato si è avuta la comparsa di sintomi generali molto imponenti. Con l'uso delle prove intradermiche specifiche è stato inoltre possibile stabilire che il 60% degli psoriasici esaminati erano epidermofitici e che il 20% erano invece microsporici; i rimanenti casi erano in rapporto con funghi di altre specie e con batteri del tipo streptococco;

3) 45 psoriasici su 54, una percentuale quindi dell'80%, sono completamente guariti o notevolmente migliorati in seguito ad un trattamento a mezzo d'un vaccino micosico specifico, preparato con tecnica nuova dagli autori e denominato clasovaccino o clasina micosica.

La psoriasi è quindi per gli autori una reazione seconda che l'organismo può presentare di fronte a diversi antigeni provocatori, la maggior parte dei quali sarebbe rappresentata da sostanze specifiche fungine. Le paracheratosi della psoriasi si sono dimostrate sterili nelle mani degli autori; è questa per essi una riprova della natura allergica delle lesioni. Il maggior numero di casi di psoriasi osservati sarebbero legati al genere *Epidermophyton*, verrebbero in seguito i casi dovuti al *Microsporon* e quelli dovuti ad altri miceti. Ma d'altronde non si può dire che la psoriasi sia sempre un'epidermofitide o una microsporide, e neanche che essa sia sempre una „micoside" perchè anche altri allergeni microbici possono essere in causa nel caso particolare.

Jausion e Guillaud-Vallée danno il massimo valore per l'insorgenza della malattia al fattore costituzionale-diatesico ed all'orientamento neurovegetativo del soggetto; la risposta allergica della cute sensibile verso diversi allergeni si farebbe in questi pazienti in senso ipercheratosico, dando la forma psoriasica, sia per il concorso di un particolare orientamento dell'organismo verso la simpaticotonia, sia pel concorso di una particolare diatesi cutanea costituzionale favorevole alle manifestazioni ipercheratosiche. Molteplici e diversi sono gli allergeni che secondo Jausion sono capaci di scatenare su questa cute tendente alle iperproduzioni cornee le classiche manifestazioni psoriasiche, ma in gran parte essi sono di natura micosica. Malattia di patogenesi univoca, la psoriasi ammetterebbe quindi eziologie multiple, e tra queste prima l'eziologia micosica.

La vaccinoterapia micosica è stata applicata da Jausion e dai suoi collaboratori al trattamento delle eczematidi, del „lichen planus" e della psoriasi. La vaccinoterapia applicata da questi autori è stata però associata in molti casi all'uso di altri agenti medicamentosi, per cui un criterio assoluto circa l'azione del vaccino micosico non si può trarre dalle loro osservazioni.

Nel Brasile J. Motta, stando alla citazione di Da Fonseca (1934), avrebbe ottenuto risultati oltremodo favorevoli nel trattamento delle eczematidi con vaccini micosici; risultati oltremodo probativi, documentati da nitide fotografie, ha poi ottenuto lo stesso Da Fonseca usando micovaccini come unico procedimento terapeutico in individui affetti da „lichen planus" e da psoriasi. Lo stesso Da Fonseca ha ottenuto elevate percentuali di reazioni positive negli ammalati di queste forme morbose con l'iniezione intradermica di tricofitina.

Sulla reattività cutanea degli psoriasici ai prodotti di derivazione fungina noi abbiamo potuto ricavare altri dati dal complesso della letteratura consultata: Falchi (1923) in 2 psoriasici saggiati nella loro reattività verso la tricofitina ha avuto in entrambi

reazioni negative; MARIANI (1923) in 6 casi di psoriasi non ha avuto una sola reazione positiva; NEGRONI (1935) ha invece avuto reazione positiva in un singolo caso saggiato di fronte ad una levurina.

Lichen planus di Wilson.

JAUSION e collaboratori (1932) in 21 casi di *lichen planus di Wilson* (o *lichen ruber di Hebra*), di cui 12 con lesioni buccali isolate od associate e tutti caratteristici per il loro aspetto clinico ed istopatologico, osservano che spesso l'eruzione del lichen è preceduta dalla comparsa di una micosi; si tratta quasi sempre di una epidermofizia. In queste condizioni l'eruzione di lichen si fa generalmente a distanza dalla lesione micosica, ma talora si sviluppa su questa stessa lesione. In tutti gli ammalati la prova intradermica con l'allergene dermatofitico polivalente è sempre positiva, con gli allergeni monovalenti la reazione risulta spesso più evidente di fronte all'epidermofitina; in qualche caso si osserva anche lo sviluppo di lesioni lichenoidi tipiche nella sede stessa dell'iniezione intradermica; 19 dei malati di JAUSION sono guariti, sebbene lentamente, in seguito ad un trattamento vaccinale micosico.

In conclusione, in tutti i casi di „lichen planus" osservati dagli autori, la manifestazione cutanea è sempre apparsa come la sequela di una forma micosica. Date le strette correlazioni esistenti tra „lichen planus" e forme cutanee micosiche e dati i risultati delle altre prove istituite sui pazienti, JAUSION ed i suoi collaboratori si son sentiti autorizzati a interpretare il lichen come una manifestazione allergica a distanza di una micosi. La teoria dell'eziopatogenesi allergica micosica verrebbe secondo gli autori a conciliare le tre correnti patogenetiche che in passato sono state affacciate per spiegare la patogenesi di questa malattia: quella di SANBERGER e BUSCHKE che la mettono in conto di una diatesi ipercheratosica, quella di BESNIER, HEBRA, PETGES, PAUTIER ecc. che interpretano la malattia come di origine neurogena e forse a punto di partenza neurovegetativo e quella di NEISSER, BROCQ, BORY, KOGOJ ecc. che ne ammettono la natura infettiva. La teoria dell'allergia micosica sarebbe il nodo che collega tra di loro tutte queste teorie, quando accanto ad essa si tengano in considerazione, come fattori accessori, il fattore diatesico e quello neurovegetativo.

Per gli autori „la réaction d'un tégument prédisposé vis-à-vis des poisons solubles d'un champignon pourrait se faire, grâce à l'entremise vago-sympathique, selon des neurones sensibles. Ainsi s'expliqueraient: la poussée lichénienne, ses rapports avec les mycoses, la positivité de la trichophytino-réaction, et l'efficacité des cures myco-vaccinales".

Eritema polimorfo.

Esistono nella letteratura diverse segnalazioni circa l'esistenza di un *eritema polimorfo* di origine tricofitica: l'eruzione dell'eritema in tali casi avverrebbe come un'eruzione allergica a distanza da un primitivo focolaio di dermatofizia e andrebbe interpretata alla stregua delle dermatofitidi. Nei variabili aspetti che la dermatofitide può assumere va quindi pure compresa la forma a tipo di eritema essudativo multiforme. L'eventualità deve essere ritenutá molto rara, almeno stando ai pochi casi che la letteratura riporta: ricordiamo i casi più antichi descritti da BLOCH e JESIONEK nei quali la dermatosi si manifestò in seguito ad un'iniezione di tricofitina e quello di RASCH. BLOCH (1928) ha riassunto molto bene i casi descritti fino al suo tempo e al suo lavoro rimandiamo il lettore per maggiori dettagli. Tra i casi recenti ricordiamo brevemente quello di GOLDSMITH e quello di GAVINA ALVARADO e BERLINGIERI.

Nel caso di GOLDSMITH (1931) in una giovane donna, 12 giorni dopo la comparsa

di una lesione intertriginosa acuta della mano da *Epidermophyton* di KAUFMANN-WOLF, si sviluppò un tipico eritema multiforme delle mani, gomiti e piedi. Esisteva uno spiccato stato allergico della cute verso la tricofitina. Non vi erano dati anamnestici circa precedenti attacchi di eritema polimorfo. Con un vaccino micosico e con adatta terapia locale si è avuta pronta e contemporanea risoluzione di entrambe le forme.

GAVINA ALVARADO e BERLINGERI (1937) riferiscono un caso clinico analogo; si trattava di una inferma che a distanza di 7 giorni dalla comparsa di un tipico herpes tricofitico sostenuto dal *Tr. E. microides* ebbe a lamentare una eruzione diffusa agli arti superiori di altrettanto tipico eritema polimorfo.

KERR, PASCHER e SULZBERGER (1934) in una memoria che abbiamo già avuto più volte occasione di citare hanno anche riportato un caso di eritema multiforme di probabile natura monilidica (oidiomicidica, secondo la terminologia degli autori); si trattava di una ragazza portatrice di una forma cutanea avente i caratteri dell',,erosio blastomicetica" in cui si è avuta acutamente in due tempi successivi un'eruzione disseminata di elementi simili a quelli descritti per l'eritema essudativo multiforme; la cute della paziente era ipersensibile in modo spiccato alla levurina (oidiomicina degli autori); le eruzioni cutanee regredirono in seguito ad un trattamento desensibilizzante con la levurina stessa.

Eritema polimorfo è stato descritto nel decorso della „valley fever" da *Coccidioides immitis.*

Pitiriasi rosea di Gybert.

GOODMAN (1931) ha avanzato l'ipotesi che le eruzioni generalizzate di *pitiriasi rosea* si debbano considerare alla stregua delle tricofitidi; l'ipotesi sarebbe avvalorata dalla frequente risposta positiva che questi ammalati danno al test intracutaneo con la tricofitina.

VAN DICK, KINGSBURY, THRONE e MYERS (1931) dallo studio di diversi casi della malattia sono giunti a risultati e conclusioni consimili.

WILLIAMS e CARPENTER (1932) hanno esaminato per controllo 29 casi di pitiriasi rosea, ma in nessun caso puro della malattia essi sono riusciti ad ottenere reazioni positive alla iniezione intracutanea di tricofitina; la tricofitino-reazione è risultata positiva solo in quei casi in cui si poteva dimostrare coi mezzi clinici e di laboratorio l'esistenza contemporanea e chiara di un'infezione tignosa dei piedi.

Come è caduta la teoria che vedeva nella pitiriasi rosea una manifestazione allergica micosica analoga alle tricofitidi, così è anche caduta quella affine prospettata da BENEDEK. Per BENEDEK l'antigene sensibilizzante nella pitiriasi rosea non sarebbe la tossina del dermatofita, ma un prodotto endo- od esotossico del suo *Schizosaccharomyces hominis.* Non è qui il luogo di elencare la congerie notevole di lavori che questo autore ha fatto nello studio di questo micete; basti ricordare che esso è considerato un costante endoparassita dell'uomo, isolabile dal sangue di ogni individuo e capace di sostenere diverse forme morbose cutanee su un terreno adatto e recettivo, sia per azione diretta che per azione a distanza con meccanismo allergico. La pitiriasi rosea di GYBERT sarebbe, per BENEDEK, una micide determinata dall'innesto del lievito, veicolato dal circolo sanguigno, sulla cute in stato di ipersensibilità verso questo parassita. Tutti gli individui sono potenzialmente candidati ad un'eruzione di pitiriasi rosea, dato che tutti albergano in circolo lo *Schizosacch. hominis* e dato che la cute di tutti è ipersensibile alla schizosaccaromicetina; ma perchè si sviluppi la micide si richiedono determinate condizioni predisponenti: una di queste, l'essenziale, sarebbe l'esistenza di una infezione luetica. Un'azione predispo-

nente eserciterebbe anche, sempre secondo le vedute di BENEDEK, la disfunzione epatica, essendo che questa porta con sè la difettosa funzione di una delle più vaste stazioni reticolo-endoteliali, batteriopessiche ed antitossiche dell'organismo umano. BENEDEK prospetta anche, per la diagnosi della pitiriasi rosea, un criterio „ex juvantibus": la guarigione dell'esantema al seguito di un trattamento desensibilizzante con l'uso della schizosaccaromicetina sarebbe una prova diagnostica di notevole valore.

Le aspre critiche che hanno suscitato i lavori di BENEDEK, specie nei riguardi della vera natura del suo *Schizosacch. hominis*, le critiche di ENGELHARDT ed altri che son venute dimostrando trattarsi del comune *Bac. megatherium* DU BARY, comunemente riscontrabile nell'organismo come semplice saprofita, la cui identità con lo *Schizosacch. hominis* è stata ammessa in un recente lavoro (1938) anche dallo stesso BENEDEK, minano fortemente questa concezione. L'eziologia micosica primaria e focale della pitiriasi rosea è stata scartata da quasi tutti i ricercatori: THOMSON e CUMINGS in un recente studio ampio e completo, corredato anche di alcuni esperimenti e di osservazioni personali, sono giunti anch'essi alla conclusione che l'infezione micosica non abbia nessuna importanza nel problema eziologico della malattia in questione.

Pseudo-bromuride di Brocq, Pautrier e Fernet.

BEINTEMA nel 1930 osservava un caso tipico di pseudo-bromuride in un individuo che presentava sintomi di broncomoniliasi; un caso del tutto analogo gli era fornito da GOEDHART. Dall'espettorato dei due pazienti BEINTEMA isolava un fungo classificato come *Parendomyces broqui*; la pseudobromuride era invece sterile tanto agli esami microscopici che a quelli colturali. Esisteva nei due pazienti uno spiccato stato allergico cutaneo verso un allergene preparato del fungo; anzi, in seguito alla iniezione intradermica del fungo ucciso al calore, si osservava nel punto sede dell'iniezione lo sviluppo dopo un certo tempo di una manifestazione cutanea in tutto sovrapponibile a quella spontanea. Nella paziente di sua osservazione BEINTEMA ha isolato il fungo, oltre che dall'espettorato, anche dalle urine e dal circolo sanguigno. Negli esperimenti sull'animale il fungo si è dimostrato dotato di uno spiccato potere allergizzante; la sindrome al completo (broncomoniliasi con pseudobromuride) è stata riprodotta nell'animale da esperimento.

Sulla base di queste osservazioni BEINTEMA avanza l'ipotesi della natura fungina della pseudobromuride. A suo modo di vedere la sterilità delle lesioni cutanee non contrasta con questa sua asserzione, anzi appoggia l'ipotesi che esse siano l'espressione di una manifestazione a distanza di tipo allergico verso un apporto fungino da un „focus" primario (la broncomoniliasi nei casi dell'autore) sulla cute previamente sensibilizzata. Appoggiano la concezione dell'autore il reperto emocolturale positivo avuto in un caso, lo stato iperergico cutaneo verso l'allergene specifico, la simultanea e completa regressione dei sintomi polmonari e cutanei e dello stato allergico cutaneo in seguito ad una terapia iodica.

La morfologia delle lesioni cutanee è presa in particolare considerazione da BEINTEMA; l'aspetto istologico delle lesioni della pseudobromuride si stacca nettamente, per i suoi caratteri di processo infiammatorio acuto e per la prevalenza dei fatti essudativo-vascolari, dalle comuni lesioni granulomatose croniche che il fungo isolato da questi casi produce nell'animale e nell'uomo nuovo. Questa è per BEINTEMA una dimostrazione dello stato iperergico cutaneo stabilitosi in seguito ad un primo contatto dell'allergene, l'espressione della modificata capacità reattiva della cute sensibilizzata.

Per BEINTEMA quindi la pseudo-bromuride di BROCQ, PAUTRIER e FERNET è da considerarsi alla stregua delle altre „idi"; ad essa, ammessa l'esattezza tassonomica del micete isolato, si conviene il termine di „parendomicide".

Malattie allergiche da' funghi

In questo capitolo noi trattiamo delle vere malattie allergiche quali *l'asma bronchiale, la corizza da fieno, l'orticaria etc.*, che hanno il loro agente eziologico preparante e scatenante in una proteina o, comunque, in altri prodotti specifici di natura fungina; a questi stati morbosi allergici si dà comunemente il nome di „allergia non infettiva", riservando il termine piu ampio di „allergia infettiva" a quegli stati di ipersensibilità che si stabiliscono invece nell'organismo in decorso di una qualunque malattia sostenuta da organismi viventi ed in atto di esplicare azioni patogene. Sulzberger definisce l'allergia non infettiva come un „mutamento di reattività che insorge nell'organismo in seguito ad un primo contatto d'una qualche sostanza inanimata (od animata, ma tale da non esplicare azioni patogene) e che si manifesta ad un secondo contatto di questa stessa sostanza preparante o di altre strettamente affini". Coca cataloga questi stati morbosi nella sua „atopia", stato allergico particolare che per le sue caratteristiche di genesi ed ereditarietà dev'essere tenuto ben distinto dalle altre condizioni allergiche note sotto il nome di anafilassi, ipersensibilità tubercolinica e malattia da siero.

Tra le diverse malattie allergiche vi sono sicuramente delle forme di *asma bronchiale* che hanno il loro agente sensibilizzante specifico in un prodotto fungino. E' già stata da tempo segnalata per opera di Cooke (1922), di McLanghlin (1927) e di altri l'esistenza di asmatici ipersensibili verso le comuni polveri delle case; ora, se noi teniamo presente che le spore fungine entrano come costituenti normali di tali polveri e che spesso anzi vi sono contenute in alte percentuali, vien fatto di pensare come probabilmente in alcuni dei casi gia ascritti in passato a fatti di ipersensibilità alle comuni polveri delle abitazioni si trattasse in realtà di casi di ipersensibilità specifica verso spore fungine e specialmente verso le spore di quelle muffe che cosí frequentemente si riscontrano negli ambienti abitati.

Comunque sia, i ricercatori cui sopra abbiamo accennato non ebbero in alcun modo a valutare questa eventualità; ed il merito di aver per primo segnalato l'esistenza di un *asma fungino*, accanto alle più frequenti forme asmatiche da pollini o da altri agenti conosciuti, va esclusivamente a Van Leeuwen il quale ha per l'appunto posto in rapporto con le muffe, fin dal 1924, alcuni casi di quel particolare tipo di asma noto col nome di *asma climatico* e che egli ha avuto modo di osservare frequentemente in Olanda. Van Leeuwen praticando nei suoi pazienti le reazioni intradermiche allergiche con gli estratti di 9 differenti specie di muffe (*Aspergillus, Mucor* e *Penicillium*) ha trovato che circa il 50% di essi erano ipersensibili a questi estratti. Storm Van Leeuwen ha anche riprodotto un asma tipico nella cavia usando nei suoi esperimenti dei semi di vegetali infettati con spore di *Pen. glaucum* e di *Asp. fumigatus* (1925).

Dal 1924 ad oggi le osservazioni di forme asmatiche da funghi si sono moltiplicate; ed in questi ultimi tempi, per opera soprattutto di autori americani, i funghi sono venuti assumendo veramente un posto di primo piano come fattori eziologici in ogni tipo di allergia respiratoria.

Le specie fungine riconosciute come asmogene sono molto numerose: ricordiamo le comuni ruggini dei cereali, tra cui la *Puccinia graminis*, l'*Ustilago zeae*, e la *Tilletia laevis* (Wittich e Stakman), la *Phoma conidiogena* (Benham), diverse specie di *Alternaria* (Hopkins, Kesten e Benham, Van der Veer, Simon) e di *Trichoderma* (Van der Veer); più frequentemente sono in causa nell'asma fungino le comuni muffe dell'ambiente, vale a dire le diverse specie di *Aspergillus, Penicillium, Mucor* e *Rhizopus* (Hansen, Bernton, Flood, Schonwald, Leopold), alcune specie di *Cladosporium* (Cobe, Bernton e Thom) e di *Coniosporium* (Towei, Sweany e Huron); non mancano i casi dovuti al *Trichotecium*

roseum, un fungo che è pure molto comune nell'ambiente, e quelli dovuti al *Poecylomyces varietii* ed ai lieviti sia sporigeni che asporigeni (HANSEN, STOVALL e BUBBOLZ, VAN DER VEER).

I casi „puri" di asma fungino si debbono peraltro ritenere molto rari; ed infatti quegli autori che hanno fatto sui loro allergo-pazienti le prove dell'allergia con allergeni di diversa natura hanno potuto dimostrare che alla sensibilizzazione verso gli estratti fungini si associa spesso uno stato di ipersensibilità ugualmente intenso ed evidente verso i comuni estratti di polline, verso la polvere, i peli etc. Quindi, come avviene per l'asma da pollini e da altri agenti asmogeni conosciuti, anche per l'asma fungino capita spesso di trovarci di fronte a casi di ipersensibilità multiple e necessita sempre attentamente vagliare questi casi per potere con profitto indirizzare i nostri provvedimenti terapeutici.

Un caso tutto particolare di allergia multipla è stato studiato recentemente da CONANT, WAGNER e RACKEMANN (1936—37); questi autori andando a ricercare quale fosse la sostanza sensibilizzante a cui erano legati i non rari casi di *asma da kapok* (materiale usato per la confezione dei materassi, cuscini etc.) hanno notato che i loro pazienti erano ipersensibili soltanto agli estratti di kapok lasciato invecchiare in cui avevano già vegetato le comuni muffe, mentre non reagivano per nulla quando erano messi a contatto con estratti di kapok fresco o sterilizzato, o anche a contatto di estratti fungini preparati dalle muffe isolate. Da questa osservazione gli autori hanno tratto il convincimento che il principio attivo sensibilizzante del kapok vecchio dipenda non dal kapok di per sè considerato o dalle muffe presenti in esso, ma dalla reciproca ed interferente azione di entrambi questi due fattori.

L'eventualità di un asma fungino dev essere ritenuta molto frequente quando si prendano in considerazione alcuni dati statistici che la letteratura ci offre in proposito. gli autori che hanno saggiato la reattività cutanea di allergo-pazienti globalmente considerati verso gli estratti fungini hanno riscontrato percentuali relativamente alte di soggetti ipersensibili verso questi estratti.

FLOOD (1931) su 55 asmatici globalmente considerati ha notato che ben 8 di essi (percentuale del 14%) davano reazioni cutanee positive di fronte ai comuni funghi dell'ambiente isolati dalla polvere delle camere abitate dagli ammalati.

ELLIS (1933) a Porto Sudan ha esaminato 50 casi di sospetto asma fungino ed ha trovato che ben 48 di essi reagivano al „test" cutaneo con sospensioni di aspergilli isolati dall'ambiente, mentre numerosi soggetti normali ed affetti da altre forme morbose non davano alcuna reazione.

FEINBERG (1935) su 243 ammalati di allergia respiratoria ne ha trovati 68 (28%) ipersensibili a una o più muffe isolate dall'ambiente.

TYLER BROWN (1936) su 20 casi di asma fungino ha trovato ipersensibilità al *Sacch. cereviasiae* nel 60%, all'*Alternaria* nel 30% e all'*Asp. fumigatus* nel 20% dei casi; egli ha notato in parecchi casi la comparsa immediata di reazioni urticarioidi dopo cutireazioni con estratti fungini.

LAMSON e ROGERS (1936) su 1259 pazienti hanno notato in 154 (12%) una ipersensibilità cutanea ad un estratto glicerico buffer mono e polivalente di muffe ed hanno trovato che più frequentemente i soggetti erano ipersensibili all'*Alternaria* (20%), al *Chaetonium* (15,9%) e all'*Aspergillus fumigatus* (12%).

VAN DER VEER (1937) su 80 pazienti saggiati con estratti fungini ricchi di 100—1000 unità proteiche ha avuto rezioni positive in 13 (16%).

PRINCE e MORROW (1937) hanno saggiato la reattività verso gli estratti fungini di

46 casi di sospetta allergia respiratoria scelti tra circa 200 casi di asma ed han trovato che 37 di essi davano nette reazioni; più frequentemente si trattava di ipersensibilità verso la *Monilia sitophila* (17), la *Mon. geophila* (13), l'*Asp. niger* (22), il *Penicillium* (15), e l'*Helmintosporium* (5).

Feinberg (1937) a Chicago e vicinanze ha potuto raccogliere 90 casi di asma ipersensibile verso le comuni muffe.

Harris (1938) ha potuto studiare 12 casi di allergia respiratoria fungina o mista: 11 di questi reagivano all'*Alternaria*, 5 ai funghi lieviti e 9 agli aspergilli.

Più recentemente Schonwald (1938) saggiando la reattività cutanea di 150 allergopazienti in cui si sospettava una sensibilizzazione verso le muffe, usando per il „test" cutaneo gli estratti di diverse specie fungine, ha avuto i seguenti risultati: per il *Pen. expansum* 77,8%, per il *Trichoderma koeningi* 72%, per l'*Alternaria tenuis* 70%, per l'*Asp. niger* 68,6%, pel *Pen. digitatum* 67,5%, e infine pel *Rhizopus nigricans* 41%.

Le percentuali di asmatici ipersensibili ai prodotti fungini oscillano in genere tra il 12 e il 28%. Nel valutare questi dati bisogna tener conto sopra tutto della regione in cui le ricerche sono state condotte: esistono zone in cui la percentuale scende sensibilmente; ricordiamo come esempio che Balyeat e collaboratori, che hanno fatto le loro ricerche nell'Oklahoma sperimentando con molteplici specie di miceti, han trovato che meno dello 1% degli asmatici è ipersensibile agli estratti fungini.

Nell'asma da funghi la via seguita dall'antigene sensibilizzante è generalmente, almeno in base alle osservazioni finora riportate dalla letteratura, quella aerea; si tratta quindi quasi sempre di un *asma da inalazione* [1]).

A questo proposito dobbiamo segnalare la frequenza con cui le spore fungine possono albergare come saprositi innocui nelle vie aeree dell'uomo, e, fatto ancor più importante, le alte concentrazioni che in favorevoli condizioni tali spore possono raggiungere nell'atmosfera. Recenti ricerche, fatte appunto in vista dell'importanza che alcuni funghi potevano avere come elementi eziologici di asma bronchiale, sono molto chiare in proposito.

Durham (1937) sulla base di una estesissima ricerca statistica condotta in diverse località degli Stati Uniti dal 1933 al 1936, considerando le dimensioni delle spore di *Alternaria* e la loro distribuzione quantitativa, conclude col presumere che esse vengano inalate in dosi comparabili a quelle dei comuni pollini.

Prince e Morrow (1937) in certe regioni costiere del Texas nel breve spazio di 24 ore hanno potuto raccogliere da un yard cubo d'aria ben 2688 spore fungine; tra queste le cifre più alte erano date dalle spore di *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Hormodendrum*, *Helminthosporium*, *Monilia* e *Cladosporium*.

Feinberg e Little (1936) hanno isolato più frequentemente dall'aria di Chicago l'*Alternaria*, l'*Hormodendrum*, il *Penicillium* e l'*Aspergillus*.

Nei riguardi dell'asma fungino vanno tenuti presenti alcuni elementi che agiscono in modo favorevole sullo stabilirsi dello stato morboso o che altrimenti concorrono a mantenerlo e a prolungarlo con notevoli danni.

---

[1]) Un *asma fungino da ingestione* è stato descritto da Taub nel 1932: il paziente di Taub, un bambino di 5 anni, aveva una spiccata ipersensibilità cutanea verso funghi lievitiformi; la prova del trasporto passivo di questa ipersensibilità è risultata positiva; l'abolizione dalla dieta degli alimenti contenenti lieviti come il pane, alcune frutta e le bevande fermentate, associata in seguito ad un trattamento desensibilizzante specifico è stata seguita da completo successo.

Va in primo luogo considerato il *fattore ambientale-geografico*. Esistono delle località nelle quali le condizioni fisiche e chimiche del terreno e dell'atmosfera favoriscono il pullulare dei miceti.

Wittich e Stakman (1937) pensano che la siccità, la scarsa umidità e i forti venti siano elementi favorevoli ad un aumento del contenuto di spore nell'aria; anche i già citati Prince e Morrow pensano che le alte percentuali di spore nelle regioni costiere del Texas da loro prese in considerazione siano dovute ai forti venti i quali ve le trasporterebbero dalle regioni paludose dell'interno.

Anche il *fattore stagionale* pare che abbia una decisa influenza sull'asma fungino. In vero una tale influenza da taluni autori è ammessa, mentre da altri è negata. I primi autori sono i più numerosi: Ellis, tra questi, osserva che nei soggetti con asma fungino i parossismi più gravi si osservano durante l'inverno; Harris, pur ammettendo un influenza stagionale, osserva invece che la sintomatologia più grave in questi ammalati si ha nei mesi estivi, e tali considerazioni fa pure Simon nel suo caso di congiuntivite allergica. Anche Jimenez-Diaz e i suoi collaboratori (1932) ritengono che il fattore stagionale abbia notevole importanza nei casi di asma climatico che essi hanno avuto occasione di osservare nelle regioni costiere della Spagna.

L'influenza che la stagione ha sulla sindrome allergica fungina viene messa in conto con le variazioni numeriche che le spore fungine disperse nell'atmosfera presentano in rapporto con le modificazioni di umidità, temperatura, ventilazione etc. che si hanno nei diversi mesi dell'anno. Il solo Van der Veer sostiene che non vi sia una decisa influenza stagionale sul contenuto percentuale di spore nell'aria, almeno limitatamente ai 7 funghi da lui studiati che sono d'altra parte i più frequenti sostenitori di forme asmatiche micosiche; Ellis invece dimostra che la percentuale di spore aumenta nell'aria di Port Sudan nei mesi piovosi dell'inverno e Schonwald giunge a risultato analogo studiando per diversi anni la frequenza delle comuni muffe nelle zone costiere del Pacifico nord-occidentale. Feinberg e Little (1936) trovano invece che il contenuto percentuale delle spore fungine nell'aria aumenta solo nei mesi più caldi dell'anno.

Non esiste nel caso dell'asma fungino un'influenza di *sesso* o di *età*: i due sessi paiono essere egualmente colpiti e così senza rapporti con determinate età.

Un ultimo punto da prendere in considerazione è l'importanza che può avere il *fattore professionale* nelle forme asmatiche fungine. Dal complesso delle osservazioni che sono state riportate bisogna convenire che esso abbia una non trascurabile importanza. Citeremo alcune segnalazioni che accennano in modo particolare a questo punto.

Una delle osservazioni più singolari è quella di Towei, Sweany e Huron (1932); questi autori hanno potuto osservare nella penisola di Michigan 35 individui che si erano ammalati di una tipica forma di asma lavorando sulle strade ferrate con materiali rotabili di legno; il loro lavoro li esponeva di frequente all'inalazione di polvere di tronchi di acero tagliati da più di un anno. Con adatte ricerche si trova che la polvere di acero contiene delle spore di un fungo identificato come un *Conidiosporium corticole* e che la cute dei pazienti, così come la cute di altri 5 soggetti sani che lavorano nella segheria, è ipersensibile agli estratti di questo fungo.

Un'altra osservazione è quella di Cadham (1924): si tratta qui di 3 mietitori che lavoravano in un campo di frumento infestato dalla ruggine; si è potuta dimostrare una sensibilizzazione specifica verso le spore della *Puccinia graminis*; uno di questi pazienti, guarito dopo essere andato a lavorare oltremare, presentò nuovamente accessi asmatici non appena ritornò a lavorare nei campi infestati. Anche Wittich descrive un caso di asma da funghi della ruggine del mais e dell'orzo.

Negli agricoltori esposti al contatto di pomodori infetti da *Cladosporium fulvum*, Cobe (1932) e Guba (1936) hanno pure descritto tipiche sindromi asmatiche fungine.

Tra le diverse malattie allergiche fungine le *forme asmatiche* sono indubbiamente le più frequenti; esse possono comparire pure o associate con altre forme morbose affini, quali la *febbre da fieno* (Bernton e Thom), l'*eczema*, l'*orticaria* etc. Feinberg (1937) su 90 casi di allergia fungina ha trovato in 55 pazienti presenza di sintomi nasali ed asmatici associati, in 9 si trattava invece di asma fungino puro ed in 26 di rinite allergica pura.

Per quel che si riferisce all'*associazione di asma ed eczema* abbiamo l'osservazione di Hopkins, Kesten e Benham (1930) riferentesi ad un asmatico ipersensibile agli estratti di un'*Alternaria* nel quale esisteva pure una forma eczematosa che dagli autori è stata messa in conto dello stesso stato di ipersensibilità verso le proteine fungine, e per quel che riguarda l'*associazione di asma e urticaria* abbiamo l'osservazione di Ramirez ed Eller in cui le due forme morbose associate erano legate ad uno stato di ipersensibilità verso un *Penicillium* verde, e l'osservazione di Wise e Sulzberger (1930) riferentesi ad una donna di 32 anni che presentava delle eruzioni cutanee urticarioidi persistenti associate ad accessi asmatici ed a corizza da fieno, e nella quale un'iniezione intradermica di tricofitina determinò una generale prurigine, violenti sternuti ed altri sintomi allergici. Ricordiamo anche l'osservazione di Kerr, Pascher e Sulzberger (1934) relativa ad un paziente di moniliasi dei piedi con monilidi nel quale l'iniezione intradermica di levurina risvegliava classici accessi di rinite vasomotoria.

Non è però da escludere che altre malattie allergiche oltre alle comuni forme asmatiche possano avere in una proteina fungina l'elemento determinante; di questo fa fede il caso di *congiuntivite allergica* recentemente illustrato da Simon (1938).

Nel caso di Simon si trattava di un uomo 38enne sofferente da tempo di frequenti congiuntiviti ad andamento accessuale e in cui i sintomi diminuivano o scomparivano del tutto quando il paziente si allontanava dal comune ambiente di vita; supposta una sensibilizzazione verso i funghi, Simon ha saggiato la reattività cutanea del paziente verso gli estratti di alcuni funghi isolati dall'ambiente ed ha ottenuto in tal modo una netta reazione verso un'*Alternaria* ed un *Cladosporium*; la istillazione nel sacco congiuntivale di un estratto di *Alternaria* ha provocato una reazione intensissima, mentre per contro è stata perfettamente tollerata da un individuo sano di controllo; una terapia con ripetute iniezioni desensibilizzanti dell'estratto di spore fungine ha confermato la diagnosi per gli ottimi risultati rapidamente conseguiti.

Anche casi di *dermatite erpetiforme*, di *psoriasi*, di *eczema*, di *dermatite venenata* vengono da alcuni autori messi in conto d'una sensibilizzazione da funghi.

Gehlen e Otto (1929) hanno notato in molti pazienti contemporaneamente affetti da asma bronchiale e da reumatismo articolare reazioni intradermiche positive di fronte ad estratti fungini di muffe comuni; essi hanno concluso ritenendo che nei loro casi lo stato di ipersensibilità verso le muffe fosse di una certa importanza nella patogenesi di questa associazione morbosa tra forma asmatica e forma reumatica.

Nei casi di asma fungino allergico le *prove di laboratorio* da seguire per giungere a stabilire la proteina eterogenea in causa sono le stesse che comunemente si praticano nelle altre forme asmatiche da pollini, etc. Ottimi risultati si sono sempre ottenuti su questi pazienti con le prove di cutireazione e di intradermoreazione usando come allergeni gli estratti del fungo (sul cui metodo di preparazione si sono soffermati in modo particolare Hopkins, Benham e Kesten); in luogo degli estratti sono stati usati a scopo diagnostico anche i filtrati delle colture fungine, ma con questo procedimento si sono avuti in genere dei risultati poco sicuri. La prova di intradermoreazione si può fare anche con le sospen-

sioni di fungo vivo, ma le reazioni generali molto intense che possono seguire la introduzione di questo allergene vivente sono tali da sconsigliarne la applicazione pratica. Anzichè introdurre l'allergene per via percutanea e intracutanea alcuni autori consigliano di iniettarlo direttamente nel sottocutaneo ed affermano che tale via è una delle più sensibili per rilevare lo stato allergico: Bernton e Thom dicono di aver ottenuto in tal modo delle reazioni molto chiare anche con dosi minime di allergene. Hansen, come metodo integrativo nella diagnosi di asma fungino, raccomanda in modo particolare la prova del trasporto passivo della ipersensibilità col metodo di Praussnitz-Küstner. Questa prova è riuscita positiva nelle mani di Hansen e successivamente in quelle di Sulzberger e Kerr, di Taub e di Brown.

Da tutti gli autori si consiglia poi di praticare nei pazienti molteplici prove perchè talora, inspiegabilmente, alcune di queste possono risultare negative e sviare così dalla giusta diagnosi. D'altra parte è consigliabile fare le prove con diversi e numerosi allergeni per poter anche svelare i non infrequenti casi di ipersensibilità fungine multiple: nel caso di Wittich, riguardante un mugnaio che già da 20 anni soffriva di asma, si sono avute reazioni allergiche cutanee positive di fronte a ben 14 diversi estratti fungini, preparati da altrettante specie fungine differenti.

Ma uno dei dati che ha la massima importanza per poter stabilire la diagnosi generica e specifica di un asma fungino sta nella dimostrazione del fungo incriminato nell'ambiente comunemente abitato dall'infermo: a questo si può giungere facilmente esponendo all'aria un certo numero di piastre con agar glucosato per 10—12 ore ed osservando se si ha o meno lo sviluppo delle specie fungine incriminate. Molta minore importanza va invece attribuita secondo noi alla dimostrazione di tali funghi nell'ambito delle vie aeree del paziente; ed infatti essendo noto quanto frequentemente funghi del tipo delle comuni muffe e dei comuni lieviti si possono isolare dalla bocca e dalla gola di individui perfettamente sani, noi non crediamo si debba attribuire a questa prova un qualche valore.

Altri autori per stabilire la natura fungina dell'agente asmogeno ricorrono a metodi particolari. Cadham in tre pazienti sensibilizzati verso la ruggine del grano riproduce parossismi di asma facendo loro inalare le spore del fungo; Benham spruzza in bocca al suo paziente ipersensibile alla *Phoma conidiogena* un estratto del fungo e riproduce un grave accesso asmatico; Hopkins, Benham e Kesten determinano l'insorgenza di un tipico accesso asmatico facendo inalare ad un soggetto sensibile l'estratto o il filtrato polverizzato di una specie di *Alternaria* od anche inoculando semplicemente il filtrato nel derma come in una comune prova di intradermoreazione.

Anche la cessazione dei sintomi asmatici con l'allontanamento del soggetto dall'ambiente abituale di vita e il loro ricomparire immediato col ritorno in esso (casi di Cadham e di Simon) sono elementi di giudizio non trascurabili. I *metodi terapeutici* utili contro l'asma fungino sono quelli stessi che comunemente si seguono per la cura delle forme morbose asmatiche di altra eziologia. Le osservazioni che verremo elencando dimostrano la notevole utilità delle *terapie desensibilizzanti specifiche.*

Ellis (1933) ha ottenuto risultati oltremodo soddisfacenti praticando su diversi pazienti un trattamento desensibilizzante con spore fungine vive; Bernton e Thom (1933) hanno praticato un trattamento desensibilizzante in 4 asmatici ipersensibili a un *Cladosporium* mediante ripetute inoculazioni di un estratto del fungo omologo ed in tre casi hanno ottenuto guarigione completa; anche Prince e Morrow, impiegando un trattamento desensibilizzante in 21 casi, in 20 hanno ottenuto un netto miglioramento della sintomatologia. Ricordiamo anche Schonwald il quale su 86 pazienti trattati con estratti

fungini specifici ha avuto guarigione completa in 66 (76,7%), associando però al trattamento specifico una terapia antiallergica aspecifica e generica.

* * *

In tema di malattie allergiche fungine dobbiamo ancora accennare all'esistenza di alcuni casi non infrequenti in cui noi troviamo una *associazione singolare tra i sintomi caratteristici di un asma bronchiale ed i sintomi proprii d'una affezione micosica in atto*; in questi casi si tratta di micosi bronchiali e polmonari in cui accanto ai sintomi broncopneumonici si manifestano accessualmente delle crisi di dispnea espiratoria, di espettorazione filante ricca di elementi caratteristici e di tutta la coorte di sintomi che si possono avere in un asma bronchiale. Tali quadri morbosi vengono a stabilire un *ponte di passaggio tra le malattie allergiche pure da funghi e gli stati allergici che comunemente si osservano nel decorso di una qualunque micosi superficiale e profonda.*

E' già da tempo noto che sintomi asmatici si possono osservare nel decorso di una micosi polmonare; la Lapham fin dal 1926 scriveva su di un caso di aspergillosi polmonare decorrente con accessi asmatici subentranti, nel quale le prove intracutanee con polvere davano nette reazioni positive, presumibilmente in rapporto con l'alto contenuto in spore aspergillari della polvere stessa.

Marett nel 1933 ha segnalato la frequenza con cui nel decorso di una moniliasi polmonare si possono manifestare sintomi asmatici: questo autore attribuisce alla sostanza acido-resistente del fungo la proprietà di proteina eterogenea capace di determinare le varie reazioni allergiche che si manifestano nel decorso di una affezione polmonare da lieviti.

Casi analoghi a quelli descritti da Marett sono stati riportati in Italia da Jacono (1927).

Steinfield (1924) ha fatto un esteso studio di ben 15 casi di associazione di broncomicosi con asma bronchiale; la broncomicosi era sostenuta da lieviti del tipo *Monilia, Cryptococcus* ed *Endomyces*. Dei 15 pazienti presi in esame, tutti meno uno, hanno dato storie cliniche negative circa pregresse sensibilizzazioni da alimenti, pollini od altri agenti asmogeni, ed hanno dato risultato negativo nelle prove allergiche verso più di 50 proteine eterogenee. I sintomi asmatici osservati dall'autore in questi casi sono stati messi in conto della micosi bronchiale essenzialmente in base a un criterio „ex juvantibus". Steinfield ha infatti notato che gli iodici avevano azione favorevole tanto sui sintomi bronchiali che su quelli asmatici e che un vaccino micosico iniettato a dosi crescenti determinava un netto miglioramento di entrambe le sintomatologie.

Ricordiamo ancora che sintomi di malattia allergica non si manifestano solo al seguito di una micosi bronchiale o polmonare, ma che essi si possono anche manifestare nel decorso di micosi cutanee superficiali.

Ne fa fede l'osservazione di Waldbott ed Ascher (1937) nella quale una dermatofizia dei piedi da *Epidermophyton interdigitale* si accompagnava ed eruzioni di orticaria cronica a ricorrenza periodica.

Sulzberger e Kerr (1930), Wise e Sulzberger (1930), Ramirez (1930) e Peck hanno potuto notare in seguito all'uso per via venosa o percutanea di tricofitina in tricofiziasici con stati allergici spiccati l'insorgenza di manifestazioni generalizzate o localizzate urticarioidi, accessi asmatici, febbre da fieno e stati febbrili, oltre ad un aggravamento delle eventuali tricofitidi presenti nel soggetto.

Sulzberger e Kerr pensano che senza dubbio l'epidermofitosi dei piedi giochi talora un ruolo eziologico nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio così come

nell'urticaria e in altre condizioni allergiche e consigliano la loro prova di contatto con tricofitina nei casi di asma, febbre da fieno ed orticaria ad eziologia ignota. RAMIREZ si professa anch'egli dello stesso parere.

Considerazioni generali e conclusioni

Lo studio dell'allergia e dell'immunità nelle micosi come da noi condotto in forma analitica e con larga copia di dettagli permette di intravvedere nell'eterogeneo gruppo delle malattie fungine umane ed animali tutto un complesso di situazioni, ora più semplici ora molto più complicate ed oscure in cui giocano i due fattori essenziali di ogni malattia da infezione; da un lato l'organismo umano ed animale con le sue molteplici facoltà reattive e dall'altro il germe aggressore coi suoi attributi di virulenza, patogenicità, tossicità ecc.; nell'alterno gioco e negli equilibri tra facoltà di difesa dell'organismo aggredito e facoltà d'offesa del germe aggressore si integra la forma morbosa così variabile nei suoi aspetti clinici ed anatomo patologici.

La situazione più semplice è quella rappresentata da un germe dotato di scarso potere patogeno che si insedi sull'organismo e vi determini una malattia che decorrerà in forma cronica, assai lenta, con scarsa o nessuna ripercussione sullo stato generale. La situazione più complessa è quella di un germe ad alta patogenicità capace di rapida diffusione e capace di compromettere rapidamente la funzione dei più vitali distretti organici.

Entrambe queste situazioni insieme a tutta la gamma delle situazioni intermedie trovano esempi nella patologia micosica. Ricordiamo che la grande maggioranza dei funghi ritenuti agenti di micosi umane ed animali sono dei saprofiti ambientali capaci di adattarsi occasionalmente od eccezionalmente sull'organismo animale; ricordiamo però anche che accanto a questi miceti patogeni occasionali si hanno degli esempi di miceti patogeni assoluti od obbligati che solo nell'organismo umano ed animale trovano le condizioni necessarie per l'esplicazione delle loro attività vitali.

La dose, virulenza e patogenicità del fungo giocano una parte importante nell'insorgenza e nel decorso della malattia, specialmente quando si tratta di miceti patogeni obbligati; una parte non meno importante gioca l'organismo aggredito con i suoi attributi di reattività, sensibilità e recettività. L'allergia è l'espressione tangibile di questa che possiamo definire in senso lato, reattività organica acquisita, capace d'oscillare entro limiti molto ampi e capace d'imprimere al decorso morboso, specie nel caso di malattia da miceti patogeni occasionali, caratteri anche molto diversi da caso a caso. Questa partecipazione del terreno organico alla malattia è chiaramente lumeggiata negli esperimenti sugli animali; chiara essa è anche nella patologia umana, quando si tenga presente che di fronte ad uno stesso agente morboso la malattia in individui diversi può assumere decorso ed esiti anche diametralmente opposti.

Il nostro studio sull'allergia e sull'immunità da miceti ha cercato di illuminare queste condizioni di reattività e sensibilità organica di fronte ai funghi patogeni, ha cercato di illustrarne i diversi aspetti clinici e anatomopatologici, di chiarirne l'importanza e l'intimo significato. In ogni singola malattia fungina vi sono i segni di una partecipazione attiva dell'organismo alla malattia; solo forse in pochi casi di forme molto superficiali e circoscritte e in pochi casi di malattie anche profonde ma sostenute da funghi ad aggressività e patogenicità molto limitata e ad azioni patogene assai rudimentali, l'organismo si comporta passivamente di fronte al germe.

Abbiamo preso in esame in singoli capitoli tutte le forme morbose fungine attual-

mente conosciute riportando anche le conclusioni principali scaturite dalla nostra disamina analitica e critica; in quest'ultimo capitolo noi cercheremo di dare una visione sintetica del fenomeno allergico e immunitario, vedendo soprattutto di risolvere il duplice quesito: *quanto gioca il fenomeno allergico nell'insorgenza della malattia micosica* e *quanto esso gioca nel regolare il quadro clinico* (*decorso ed esito*) e *anatomo patologico* (*manifestazioni morfologiche*) *della malattia stessa.*

* * *

Da quanto siamo venuti esponendo in modo analitico è possibile sintetizzare non pochi fatti atti a dimostrare *la necessità di preparazioni sensibilizzatrici dell'ospite da parte dell'antigene fungino per l'insorgenza della malattia micosica.* Il concetto teorico per il quale una malattia perchè possa evidenziarsi deve scaturire dall'incontro di situazioni particolari rappresentate da una parte da una dose di antigene aggressore e dall'altra dal terreno reso particolarmente e specificamente recettivo da una precedente azione dello stesso o di altri antigeni, e il concetto analogamente teorico che la seconda delle due situazioni suddette debba essere particolarmente importante quanto meno l'agente aggressore è, in senso lato, patogeno, sembrano trovare proprio nello studio delle micosi non pochi elementi chiarificatori.

E' d'uopo qui ricordare ancora che, salvo eccezioni limitate, la grande maggioranza dei funghi ritenuti agenti delle micosi umane ed animali sono dei saprofiti ambientali i quali si adattano solo occasionalmente od eccezionalmente e, in ogni caso soltanto temporaneamente, all'organismo animale con modalità d'azione e manifestazioni morfologiche proprie molto limitate e rudimentali. Fra tutti questi miceti, *parassiti patogeni occasionali*, ve ne sono certamente di quelli che più degli altri riescono a vivere a spese di tessuti animali viventi ed a vincere le difese generiche delle reazioni dell'ospite; tuttavia sono vere eccezioni quelli che solo nell'organismo animale riescono a trovare la più perfetta condizione di vita: queste eccezioni costituiscono un gruppo a sè, quello dei *miceti patogeni assoluti od obbligati* dotati generalmente di forti poteri di aggressività e di patogenicità. E' per questi ultimi che, richiamandoci ai concetti teorici sopra esposti, si potrebbe presupporre esser sufficiente la presenza e l'azione del fungo per la comparsa della forma morbosa, agendo in questi casi l'ospite in modo assolutamente passivo o con reazioni inefficaci di fronte all'aggressore. Ma vedremo che anche per queste forme morbose (granuloma coccidioide, granuloma paracoccidioide, istoplasmosi etc.), se non fatti definiti, certo analogie permetteranno di affermare che l'ospite, come terreno recettivo, contribuisce al meccanismo patogenetico della malattia.

Gli esempi più chiari che lumeggiano situazioni di particolare recettività ed iperrecettività (allergia ipoergica od anergia negativa) per la comparsa di stati morbosi fungini li troviamo nello studio dell'*actinomicosi spontanea* e dell *actinomicosi sperimentale.* Taluno potrebbe obiettare che le malattie actinomicosiche non si possono a rigor di termini considerare come vere malattie fungine, appartenendo gli *Actinomyces* ad un „phylum" molto più vicino ai bacteri che non ai funghi veri e proprii; non è qui il luogo di entrare in una discussione su questo punto che toccherebbe le questioni molto più vaste sui confini, tuttora imprecisati, tra i miceti, gli schizomiceti e le alghe. Noi seguiamo la ordinaria convenzione che considera almeno certi generi degli *Actinomyces* come veri funghi, non dimenticando che altri generi vicini si collegano agli schizomiceti comportandosi morfologicamente e biologicamente come questi ultimi. Il ricordo delle parentele abbastanza strette tra le *Mycobacteriaceae* e gli *Actinomyces* in senso stretto ci invoglia a richiamare tutti i complessi ed interessanti problemi che si riferiscono all'importanza

dell'allergia nella genesi e nell'evoluzione della tubercolosi e della lebbra umana ed animale per lumeggiare gli analoghi fenomeni delle actinomicosi. Questo richiamo potrebbe di per sè costituire l'argomento di un lavoro di non piccola importanza sotto molti punti di vista; su di esso non ci possiamo intrattenere qui se non per confortare le successive tuttora scarse affermazioni circa il significato dell'allergia nella genesi e nell'evoluzione dell'actinomicosi con le conclusioni molto generiche e talora imprecise sui rapporti fra di essa e le malattie tubercolari e leprose. Le prove sperimentali (Dessy, Redaelli etc.) sono nelle loro conclusioni abbastanza esplicite per l'ammissione della possibile creazione attraverso meccanismi sia pure oscuri, ma che sicuramente cimentano gli apparati istogeni ed umorali delle difese dell'organismo, di condizioni di allergia ipoergica atte a favorire l'insorgenza di una malattia che si protrae quindi con alterne vicende e con diverso esito a seconda di equilibrii successivamente succedentisi. Sembrano essere trattamenti ripetuti con piccolissime dosi di antigene actinomicosico (appoggiando sotto questo punto di vista le vedute più volte espresse da Zironi) quelli che più facilmente portano allo stabilirsi di stati allergici ipoergici: solo questi possono spiegare la facilità dell'adattamento di un agente scarsamente aggressivo, quale è in genere l'*Actinomyces*, e la comparsa di una actinomicosi. Certo queste conclusioni non sembrano facilmente estensibili alla patologia umana ed animale spontanea. A noi mancano in genere le possibilità di precisare in ogni caso le modalità e le ragioni dello stabilirsi dell'actinomicosi spontanea: è certo però che moltissimi elementi lasciano pensare che anche in queste forme possano aver influenza delle situazioni non differenti da quelle sperimentali.

I dati clinici ed i quadri anatomici del granuloma actinomicosico umano (prevalenza di fatti essudativi vascolari sulle reazioni granulomatose iperplastiche, scarsa tendenza ad una guarigione spontanea, difficile cedere del processo morboso a terapie anche specifiche, comportamento del parassita nei focolai morbosi, etc.) parlano poi per l'importanza di situazioni di iperrecettività nella evoluzione della malattia fungina.

Boquet e Nègre nella loro monografia sulla linfangite epizootica, sia pure in via ipotetica, pensano anch' essi all'eventualità che la malattia actinomicosica sia il risultato di inoculazioni multiple ripetentisi in un breve lasso di tempo, risultato quindi di uno stato di iperrecettività preparato da piccole e ripetute dosi di fungo; e si rifanno per analogia a quanto Calmette e Guérin hanno dimostrato per la tubercolosi sperimentale dei bovini: potersi cioè ottenere la tubercolizzazione degli animali solo somministrando per via orale ripetute piccole dosi di bacilli virulenti e non con una dose unica e massiva.

La *linfangite epizootica* dei solipedi, per gli studi di Boquet e Nègre, ci offre anch'essa uno dei più chiari esempi atti a testimoniare l'intervento di situazioni ipoergiche od anergiche nell'insorgenza delle malattie micosiche. Quadri sperimentali perfettamente sovrapponibili a quelli offerti dalla malattia spontanea in questione, Boquet e Nègre hanno ottenuto infatti solo a mezzo di ripetute inoculazioni di piccole dosi di fungo. La linfangite epizootica, in quanto determinata dall'*Histoplasma farcinimosum* e quindi da una specie fungina che per la sua posizione sistematica fa parte di una famiglia dei lieviti asporigeni (Histoplasmaceae), può essere in senso molto lato considerata una malattia da lieviti e può essere quindi portata come esempio, per ciò che stiamo discutendo, della possibilità che anche nelle forme morbose da lieviti intervengano condizioni preparanti nel senso da noi sostenuto.

Anche per le *micosi da lieviti* (prevalentemente asporigeni, Torulopsidaceae) i risultati delle ricerche sperimentali sono abbastanza dimostrativi. Le ricerche di Kurotchkin e Lim nella genesi di micosi polmonari da *Monilia tropicalis*, quelle di Ninni e Fittipaldi che hanno ottenuto stati di netta iperrecettività di fronte a dosi anche piccole di stipiti

di *Candida* in animali pretrattati con gli stessi stipiti, i miei stessi esperimenti con stipiti di *Mycotorula albicans* e le recenti osservazioni di Owen, Anderson ed Henrici sono tutte concordi nei riguardi della possibilità di creare degli stati sperimentali di iperrecettività. Anche nel tentativo di riprodurre la *dermatite verrucosa cromomicosica* da *Hormodendrum pedrosoi* una condizione di iperrecettività specifica creata da un precedente trattamento del micete rimasto senza effetto, sembra essere indispensabile per l'insorgenza della malattia ad una seconda iniezione di antigene (Gomes a Pessôa).

Un larvato accenno alla possibilità che stati di ipersensibilizzazione (con iperrecettività) siano responsabili dell'insorgenza anche della *sporotricosi* spontanea è stato prospettato già dal 1909 da De Beurmann e Gougerot: questi autori pensano addirittura che lo sporotrico albergando innocuamente sulle mucose dell'ospite lo sensibilizzi e lo modifichi a mezzo dei suoi prodotti. Con questo gli autori intravvedono la possibilità che anche il semplice commensalismo fungino possa acquistare un significato biologico come momento patogenetico in malattie specifiche.

* * *

Una volta stabilitasi la malattia micosica, la sua evoluzione ed il suo esito sono sicuramente regolati dal comportamento delle capacità reattive umorali ed istogene dell'ospite, sotto l'influsso degli equilibrii allergici che con alterne vicende possono succedersi, qualitativamente e quantitativamente variabili.

Sembra che nella maggioranza dei casi allo stato iniziale di iperrecettività che permette e giustifica l'insorgenza della malattia, per il crearsi di condizioni progressivamente benefiche per l'ospite durante la lotta contro il parassita, l'allergia volga verso condizioni di iperreattività da parte dei tessuti difensivi sino alla eliminazione totale del parassita e alla guarigione della malattia, anche se non si creano sempre degli stati di anergia positiva (immunità). In tutti questi casi generalmente la malattia fungina resta limitata e circoscritta e i rilievi sierologici ed istogeni giustificano l'interpretazione dei fenomeni nel senso suddetto.

In altri casi l'evoluzione della forma morbosa ha caratteri di malignità e l'esito è infausto: per alcuni di questi casi, per quelli soprattutto in cui giuoca la sua azione un fungo parassita patogeno assoluto obbligato, potremmo tranquillamente accontentarci della ammissione che sia sufficiente il micete con le sue capacità intrinseche ad estendere la forma morbosa in modo progressivo sino a un esito letale.

Le tuttora molto limitate conoscenze circa la natura e l'evoluzione di fenomeni allergici nel granuloma coccidioide e paracoccidioide (le due più importanti forme morbose tra le pochissime note sostenute da funghi parassiti patogeni assoluti) non ci permettono ancora di poter chiarire il problema in discussione: la tendenza alla progressiva generalizzazione dei focolai morbosi, il silenzio quasi completo per ciò che si riferisce ai fenomeni rivelabili coi saggi sierologici ed umorali, non ostante la presenza di stati generali di sensibilizzazione rivelati dalle prove cutanee (di cui tuttavia non conosciamo il preciso valore allergico), sono elementi che lascerebbero supporre negli individui la mancanza di reazioni a carattere nettamente benefico come si ritiene avvengano negli stati di allergia iperergica.

L'esito infausto dopo un'evoluzione rapida con quadri di diffusione e di generalizzazione della malattia fungina si possono tuttavia verificare anche secondariamente all'azione locale (micosi circoscritta) di funghi parassiti patogeni occasionali od eccezionali. Che la generalizzazione dell'agente fungino da un focolaio circoscritto possa avvenire attraverso le comuni vie di diffusione è un fatto che si verifica, se non di frequente, certo

in alcuni casi: però non sempre a questa diffusione dell'agente segue una grave malattia generalizzata con manifestazioni di carattere setticemico o con semplici localizzazioni a distanza. Il verificarsi dell'un caso o dell'altro deve dipendere sicuramente dallo stato di recettività acquisito durante il decorso della malattia circoscritta ed integrato da quelli che oggi chiamiamo movimenti allergici.

Nell'un caso per essersi stabilite condizioni di allergia ipoergica, il parassita patogeno occasionale, sempre ad aggressività limitata non ostante che si diffonda nell'organismo nella sua qualità di micete animalizzato per l'adattamento avvenuto nel focolaio primitivo, si localizza a distanza in molteplici focolai, mentre le reazioni sierologiche e gli aspetti della reazione istogena sono quelli propri dei debilitati nelle loro capacità difensive. Talora la generalizzazione dell'agente fungino avviene secondariamente alla caduta delle potenzialità difensive dell'ospite: lo stato di anergia negativa conclamata permette la realizzazione di veri e proprii stati setticemici. Gli esempi sono molteplici, e li ritroviamo nelle actinomicosi, nelle generalizzazioni cosidette sistemiche (blastomicosi sistemiche degli autori americani, „pro parte") secondarie alle dermatite verrucosa di Gilchrist, nelle localizzazioni multiple prevalentemente meningee e cerebrali da *Debariomyces neoformans* nelle cosidette torulosi americane; mentre esempi di setticemie micosiche da anergia negativa sono quelli descritti come setticemie e setticopiemie actinomicosiche (streptotricosiche), i pochi casi noti di setticemie da lieviti secondarie a mughetto o ad altre localizzazioni simili, e infine, tra le micosi da dermatofiti, quei pochi casi di generalizzazione con esito infausto.

D'altro canto invece ad una generalizzazione di elementi fungini da un focolaio primitivo circoscritto può mancare qualsiasi risposta di carattere periferico diffuso (batteriemie micosiche); oppure si possono avere delle risposte che rivelano l'insorgenza di condizioni generali di ipersensibilità con iperreattività (allergia iperergica). Esempi più tipici di questi fenomeni sono quelli che ci sono dati dalla patogenesi delle „idi": dermatofitidi, levuridi, aspergillidi, sporotrichidi, acremonidi etc. Non si può tralasciare dal ricordare che tutte le condizioni intermedie dalla anergia negativa sino alla allergia iperergica con le più svariate sfumature, che giustificano diversi reperti umorali ed istogeni, sono possibili a realizzarsi nel corso evolutivo di micosi spontanee dell'uomo e degli animali.

In tutti questi casi *lo studio dei fenomeni umorali ed istogeni ci offre elementi positivi che giustificano l'andamento clinico delle forme morbose e i ragionamenti generali sulle variazioni della sensibilità dell'ospite*: in linea generica, negli stati di *allergia ipoergica* le prove sierologiche si presentano negative o solo debolmente positive, l'infiammazione prevale con elementi essudativo-vascolari talora necrotico-emorragici, mentre il parassita è sempre abbondantemente presente e florido; nelle condizioni di *allergia iperergica* i procedimenti sierologici indicano generalmente una vivace capacità difensiva dell'organismo e nella forma dell'infiammazione prevalgono i fenomeni produttivo iperplastici con tendenza alle segregazione del parassita che di solito è in numero limitato, con forme di sofferenza e rapidamente eliminato o distrutto.

Queste considerazioni appaiono forse eccessivamente categoriche e schematiche: naturalmente abbiamo esposto qui una sintesi definitiva di quelli che sono i principali orientamenti del movimento allergico e delle sue rispondenze umorali ed istogene. Non si deve dimenticare che ogni singolo caso alla minuta analisi non sempre si presenta chiaro all'interpretazione, la quale deve tenere in considerazione volta a volta la natura dell'antigene, la sua qualità quale ci può essere fornita dalle conoscenze desunte dallo studio micologico e sperimentale della specie fungina, la recettività dell'ospite rispetto a

quella specie o al gruppo di specie di un dato genere o di una data famiglia, la cui conoscenza ci deriva dallo studio della patologia del capitolo relativo, la possibilità che i movimenti allergici si modifichino nel corso della malattia fungina con rispondenze e conseguenze varie e per fattori in gran parte sconosciuti. In merito a quest'ultimo fatto non debbono fare meraviglia quei casi in cui esistono incongruenze tra i reperti delle prove istogene umorali ed i quadri clinici con cui la malattia si manifesta e decorre: è possibile infatti riscontrare talora coesistenti (soprattutto tra le manifestazioni delle reazioni dei tessuti) aspetti che denoterebbero una contemporanea presenza di condizioni allergiche anche tra di loro opposte.

La conclusione generale che si può trarre da quanto veniamo dal dire è che, se nell'insorgenza delle malattie fungine è probabilmente in giuoco un fattore di iperrecettività stabilitosi in seguito a ripetuti contatti del fungo con l'organismo ospite, *nel decorso e nell'evoluzione delle malattie stesse sono in giuoco nuovi stati di sensibilizzazione, ora orientati verso l'ipoergia e l'anergia negativa, ora invece verso l'iperergia e l'anergia positiva (immunità), che del decorso e degli esiti della forma morbosa micosica sono i responsabili, orientandola essi in vario senso a seconda degli stati di ipersensibilità acquisiti dall'ospite.*

* * *

L'oscurità che regna intorno alla vera essenza ed alla precisa natura dei fenomeni dell'allergia è per grandissima parte legato alla mancata conoscenza dell'intima costituzione dell'allergene; questo fatto è particolarmente significativo ed i problemi ad esso inerenti oltremodo difficili a risolversi quando l'antigene è un essere vivente, del quale noi possiamo conoscere relativamente bene la struttura e la costituzione chimica allorquando si comporta da saprofita ambientale o colturale, ma che sfugge ad una nostra profonda indagine quando esplica le sue attività biologiche intimamente connesso ai tessuti animali che lo ospitano. In altre parole, se con una ricerca accurata noi possiamo svelare i principi allergizzanti di un micete coltivato in terreni definiti, quasi impossibile ci resta l'indagine degli stessi principi del fungo in stato di animalizzazione. Il trasportare le conclusioni tratte dallo studio dell'allergia „in vitro" alla interpretazione della sua intima attività „in vivo", se in linea generale può esser logica ed abbastanza giustificata, tuttavia ci lascia sempre dubbiosi per il ragionamento che il fungo allo stato di animalizzazione, come è modificato morfologicamente e citologicamente, possa esserlo anche biologicamente. D'altra parte nessuno si nasconde l'importanza che la precisa conoscenza dell'allergene può avere per l'interpretazione delle reazioni che esso induce nell'ospite, a lor volta quanto mai oscure e difficili ad indagarsi. L'indagine scientifica delle micosi spontanee e sperimentali deve quindi ancora attendere in modo particolare all'indagine dell'antigene allergizzante che per essere un microorganismo capace di vita diversa, saprofitaria e parassitaria, deve essere totalmente indagato sia „in vitro" che „in vivo".

Nella patologia fungina dell'uomo tuttavia un non piccolo capitolo, sebbene ancora agli inizi del suo sviluppo, ci porta a considerare un gruppo di affezioni nelle quali l'antigene allergizzante di natura micosica si differenzia da quello considerato come agente delle forme morbose che vanno sotto il nome di micosi in quanto *non capace di vivere e di evolvere entro i tessuti animali viventi come parassita, ma solo capace di agire sui tessuti stessi come materiale eterogeneo non vitale.* L'allergene fungino è rappresentato in questi casi generalmente da spore di funghi ambientali appartenenti alle più svariate famiglie, le quali spore come costituite essenzialmente da proteine sono capaci di sensibilizzare i tessuti coi quali vengono a contatto con un meccanismo probabilmente non molto diverso da quello che si avvera nei processi di sensibilizzazione anafilattica.

In questi casi, mentre da una parte l'antigene allergizzante potrebbe essere più facilmente indagato nella sua intima costituzione in quanto è sufficiente il suo studio „in vitro", le forme morbose che derivano dalla sua azione non integrano quadri specifici anatomici e clinici, ma sono rappresentate generalmente da episodi non dissimili da quelli illustrati come asma bronchiale, corizza da fieno, orticaria etc.

Le questioni che sono inerenti a queste *malattie allergiche da funghi* debbono essere tuttora approfondite, sia per ciò che si riferisce alla natura degli antigeni e alla loro azione allergizzante e sia anche per ciò che riguarda le loro manifestazioni anatomiche. Gli studiosi che si sono fin qui occupati dell'argomento hanno creduto di interpretare molto semplicisticamente i fenomeni sulla base delle conoscenze che si hanno per le analoghe malattie da proteine eterogenee di natura diversa da quella fungina.

Prendendo in considerazione le specie fungine agenti di micosi spontanee e sperimentali (parassiti patogeni assoluti ed occasionali), si constata in linea molto generale che esse specie coincidono di solito, per modalità di vita ambientale e per capacità biologiche „in vitro" ed „in vivo" con le specie che dagli autori sono state più frequentemente incriminate come le fornitrici di antigeni sensibilizzanti nella genesi di malattie allergiche da funghi in senso stretto.

Le specie chiamate in causa nelle malattie allergiche fungine non solo appartengono al gruppo dei parassiti occasionali, ma molto frequentemente appartengono a generi che non hanno mai interessato la patologia umana, come *Cladosporium, Puccinia, Ustilago, Helminthosporium, Alternaria, Phoma, Monilia* (senso PERSOON), *Trichoderma, Tilletia etc.*, specie che sono strettamente ambientali e che sotto certi punti di vista interessano maggiormente la patologia vegetale.

Nella patogenesi delle suddette malattie allergiche tuttavia sono considerate anche le specie dei generi *Aspergillus, Penicillium, Mucor* etc. delle quali conosciamo anche la possibilità di causare micosi di svariati apparati (cutaneo, polmonare, oculare, auricolare, ecc.). Questo rilievo ci riconduce alla considerazione di quegli interessanti casi nei quali accanto ad una localizzazione fungina integrante una conclamata malattia micosica, esiste una sintomatologia che giustifica l'affermazione della coesistenza di una malattia allergica micosica in senso stretto; in questi casi l'antigene, oltre che localizzarsi e indurre reazioni di tessuti integranti forme varie di patosi e di patiti micosiche, si comporta da allergene capace di creare sensibilizzazioni rivelantisi con forme cliniche ed anatomiche di asma, di orticaria, etc. Per la delucidazione di questi fatti anche qui fa difetto la conoscenza della precisa natura dell'antigene. E' certo però che questi casi oltremodo interessanti ci confortano allorchè esponiamo le ipotesi sull'intervento di meccanismi di sensibilizzazione e di reazione modificata dell'organismo ospite nella genesi delle più conclamate malattie fungine.

* * *

Bibliografia

Allergia nelle malattie a presunta eziologia micosica

Balbi E., Il Dermosifil., 2, (1931). — Beintema K., Tesi di dottorato, Groningen (1930), 188 pp.; Ann. Derm. Syphil., VII, **4**, 399, (1933). — Benedek T., Derm. Wochs., **86**, 425, (1928); ib., **86**, 536, (1928); ib., **87**, 1890, (1928); Acta Derm.-venereol., **9**, 76, (1928); Derm. Wochs., **89**, 1355, (1929); ib., **90**, 633, (1930); Urol. Cut. Dis. Rev., **35**, (4), (1931); Arch. Derm. a. Syph., **26**, 397, (1932); Mycopathologia, **1**, (1), (1938). — Bernstein F., Derm. Zeitschr., **59**, (6), 385, (1930). — Bigham, Brit. Jour. Derm. Syph., (8), (1937). — Bloch Br., Handb. d. Haut. u. Gesch. (Jadassohn), 11, 564, (1928). — Dick L. S. van, Kingsbury J., Throne B., e Myers C. N., New York State Jour. Med., **31**,

611, (1931). — Engelhardt W. e altri, Arch. Derm. u. Syph., 157, 588—592, (1929); ib., **158**, 276, (1929). — Ealchi G., XX Riun. Soc. It. Derm. Sif., Firenze (1923). — Fonseca O. da, Rev. Med.-Chirurg. Brasil, **42**, (9—10), (1934). — Gavina Alvarado E. R. e Berlingieri A., Riv. Argent. Dermatosifilol., **20**, (3), (1937). — Goldsmith W. N., Brit. Jour. Derm. Syph., **43**, (3), 121, (1931). — Goodman H., Arch. Derm. a. Syph., **23**, 873, (1931).

Hill L. W., Jour. Am. Med. Assoc., **103**, (5), 331, (1934). — Jadassohn W. e Ju-Wu-Mu, Arch. Derm. u. Syph. **162**, 1, (1931). — Jauison H. e Guillaud-Vallée, Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, III, **48**, 1599, (1932). — Jauison H., Guillaud-Vallée e Pecker, Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, III, **48**, 1592, (1932). — Jauison H., Lenègre e Vendel, Bull. Soc. Franc. Derm. Syph., 2 febbraio (1928). — Jauison H., Lima de, Guillaud-Vallée e Pagès, Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, III, **48**, 1583, (1932). — Kater J. McA., Univ. California Publ. Bot., **14**, 301, (1928). — Kerr Ph. S., Pascher F. e Sulzberger M. B., Jour. Allergy, **5**, (3), 288, (1934). — Mariani G., Giorn. It. Mal. Vener. Pelle, **64**, 587, (1923). — Moore M., Arch. Uruguayos Med. Cirurg. Especial., **8**, (3), 245, (1936). — Moore M. e Kile R. L., Science, **81**, (2098), 277, (1935). — Moore M., Kile R. L., Engman M. F. Jr. e Engman M. F., Arch. Derm. a. Syph., **33**, 457, (1936). — Negroni P., Rev. Inst. Bacter. Bs. Ayres, **7**, (3), 386, (1936). — Ravaut P., Presse Méd., (104), 1787, (1930). — Thomson e Cumings, Brit. Jour. Derm. Syph., (12), (1931). — Wachowiak M., Stryker G. V., Marr J., Bock H. e Fleischer M. S., Arch. Derm. a. Syph., **19**, (5), 713, (1929). — White Cleveland, Arch. Derm. a. Syph., **18**, 429, (1928). — Williams C. M. e Carpenter C. C., Arch. Derm. a. Syph., **25**, 847, (1932). — Fleischer M. S. e Wachowiak M., Arch. Derm. a. Syph., **11**, 756, (1925).

Malattie allergiche da funghi

Balyeat R. M., Stemen T. R. e Taft C. E., Jour. Allergy, **3**, 227, (1932). — Benham R. W., Bull. Torrey Bot. Club, **58**, (4), 203, (1931). — Bernton H. S., Jour. Am. Med. Assoc., **95**, (3), 189, (1930). — Bernton M. S. e Thom C., Jour. Allergy, **8**, (4), 363, (1937). — Brown G. T., Jour. Allergy, **7**, (5), 455, (1936). — Cadham E. T., Jour. Am. Med. Assoc., **83**, 27, (1924). — Cobe H. M., Jour. Allergy, **3**, 389, (1932). — Coca A. F., Jour. Allergy, **1**, (1), 75, (1929). — Conant N. F., Wagner H. C. e Rackemann, Jour. Allergy, **7**, 234, (1936). — Cooke R. A., Jour. Immunol., **7**, 147, (1922). — Durham O. C., Jour. Allergy, **8**, (5), 480, (1937). — Ellis D., Guy's Hosp. Repts., **83**, (1), 102, (1933). — Feinberg S. M., Wisconsin M. J., **34**, 254, (1935); Lancet, **57**, 87, (1937); Jour. Allergy, 9, (3), 282, (1938). — Feinberg S. M. e Little H. T., Jour. Allergy, **7**, (2), 149, (1936). — Flood C. A., Jour. Am. Med. Assoc., **96**, (25), 2094, (1931). — Gehlen H. e Otto J., Deutsch. med. Wochs., **55**, 1964, (1929). — Guba E. E., Elor. Rev., **78**, 32, (1936). — Hansen K., Verhandl. d. deutsch. Gesellsch. f. inn. Med., **40**, 204, (1928). — Harris L. H., Ohio State Med. Journ., **34**, 158, (1938). — Hopkins J. G., Benham R. W. e Kesten B. M., Jour. Am. Med. Assoc., **94**, 6, (1930). — Hopkins J. G., Kesten B. M. e Benham R. W., Proceed. Soc. Exper. Biol. Med., **27**, 342, (1930). — Jimenez Diaz C., Sauchez Cuenca B. e Puig J., Jour. Allergy, **3**, 396, (1932). — Lamson R. W. e Rogers E. L., Jour. Allergy, **7**, (6), 582, (1936). — Lapham M. E., Jour. Am. Med. Assoc., **87**, (13), 1031, (1926). — Leeuwen Storm van W., J. B. Lipincott e C., Filadelfia (1925), 58 pp.; Proc. Roy. Soc. Med. (Sect. Therap. a. Pharm.) **17**, 19, (1924). — Leeuwen Storm van W., Bien Z., Kremer W. e Varekamp H., Zeitschr. Immunität., **44**, 1, (1925). — Leopold S. S., Jour. Allergy, **7**, (6), 594, (1936). — Marett P. J., Brit. Med. Jour., **1**, 917, (1933). — McLanghlin J. S., Jour. Am. Med. Assoc., **89**, 863, (1927). — Prince H. E. e Morrow M. B., Jour. Sth. Med. Assoc., **30**, (7), 754, (1937). — Prince H. E., Selle W. A. e Morrow M. B., Texas State Jour. Med., **30**, 340, (1934). — Ramirez M. A., Med. Jour. Rec., **132**, 382, (1930). — Ramirez M. A. e Eller J. J., Jour. Allergy, **1**, 489, (1930); Jour. Am. Med. Assoc., **95**, 1080, (1930). — Schonwald P., Northwest Med., **36**, 14, (1937). — Simon F. A., Jour. Am. Med. Assoc., **110**, (6), 440, (1938). — Steinfield E., Jour. Am. Med. Assoc., **82**, (2), 83, (1924). — Stovall W. D. e Bubolz A. A., Jour. Lab. Clin. Med., **18**, (9), 890, (1933). — Sulzberger M. B., Med. Jour. Rec., **131**, (8), 392, (1930). — Sulzberger M. B. e Kerr P. S., Jour. Allergy, **2**, 11, (1930). — Taub S. J., Jour. Allergy, **3**, 586, (1932). — Towei J. W., Sweany H. C. e Huron W. H., Jour. Am. Med. Assoc., **99**, (6), 453, (1932). — Veer Vander A., Jour. Allergy, **8** (3), 277, (1937). — Wagner H. C. e Rackemann F. M., Ann., Int. Med., **11**, 505, (1937). — Waldbott G. L. e Ascher M. S., Arch. Derm. a. Syph., **36**, (2), (1937). — Wise F. e Sulzberger M. B., Jour. Am. Med. Assoc., **95**, (20), 504, (1930). — Wittich F. W. e Stakman E. C., Jour. Allergy, **8**. (2), 189, (1937).

Un quadriennio di attivita' del centro di micologia umana e comparata di Pavia

(1938—1941)

di

PIERO REDAELLI e RAFFAELE CIFERRI

(*dall'Istituto di Anatomia Patologica della R. Univ. di Pavia e dall'Istituto Botanico, Facoltà di Agraria, R. Univ. di Firenze*)

(1.XI.1941.)

Verso la fine dell'anno 1938 è stato reso noto con un opusculo (Costituzione, organizzazione e attività del centro di micologia umana e comparata, istituito presso l'Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica della R. Università di Pavia, Tip. già cooperativa, Pavia, 1938), la fondazione di un centro di studi e di ricerche nel campo della micologia e della micopatologia applicata alla medicina umana ed alla patologia animale. Desideriamo qui rendere noto il lavoro compiuto nei quattro anni ora trascorsi a testimonianza dell'attività svolta nel campo specifico della parassitologia fungina animale.

L'attrezzatura del Centro si è sempre più perfezionata grazie al particolare interessamento dei Magnifici Rettori della R. Università di Pavia che si sono succeduti in questo lasso di tempo, il Sen. Prof. PAOLO VINASSA DE REGNY ed il Prof. CARLO VERCESI; anche il funzionamento del Centro viene avvantaggiato da sovvenzioni vuoi del Consorzio Provinciale Pro Ateneo Pavese, vuoi dell'Amministrazione dell'Università di Pavia. In tal modo si è potuto assicurare l'arrichirsi continuo di volumi e periodici per la bilioteca specializzata, l'acquisto di apparecchi scientifici (microscopi, micromanipolatori, apparecchi fotografici, ecc.) l'installazione di impianti speciali (camera per lavori sterili, frigoriferi, ecc.), la conservazione della micoteca e la preparazione di schedari biliografici che raccolgono le pubblicazioni micologiche e micopatologiche del 1800 sino ai nostri giorni e che serviranno per la pubblicazione di una **Bibliographica Mycopathologica** per i tipi della Uitgeverij Dr. W. JUNK (GROETSCHEL et v. ASSEMA METZ) dell'Aja (Olanda). Il Centro si avvantaggia anche dei fondi di una donazione fatta dalle Famiglie BRIOSCHI e CALCHI-NOVATI per onorare la memoria della Signora MARCELLA REDAELLI CALCHI-NOVATI: vengono sovvenzionate le ricerche degli studiosi che lavorano nel laboratorio specializzato.

Nel Centro ha sede la Redazione del periodico internazionale **Mycopathologia** fondato da CIFERRI, R. e. REDAELLI P. nel 1938 e che viene pubblicato con ottima veste tipografica e con particolare ricchezza di tavole e figure dalla Uitgeverij Dr. W. JUNK dell'Aja. Il periodico è arrivato a completare il suo terzo volume e comprende più di ottanta lavori originali italiani e stranieri nei più svariati argomenti della micologia e micopatologia umana e comparata.

E' in corso di stampa il volume **le granulomatosi fungine dell'uomo nelle zone tropicali e subtropicali,** opera della collaborazione di P. REDAELLI ed R. CIFERRI, per i tipi della Tipografia del Libro (Pavia); è inoltre in preparazione un volume che raccoglierà la descrizione di tutti i lieviti sperigeni ed asporigeni del mondo ad opera di R. CIFERRI, O. VERONA, P. GIACOMINI e P. REDAELLI.

Nei quattro anni trascorsi, il Centro è stato frequentato da studiosi con l'intento

del perfezionamento nel campo specializzato della micologia applicata alla medicina umana: ricordiamo il Dr. Giorgio Petronici assistente nella Clinica Dermosifilopatica della R. Università di Palermo; il Dr. Francesco Colonnello Vice-Direttore dell'Istituto di Medicina Tropicale del Comune di Milano e lo studente laureando Angelo Orlandi di Milano che attendono tuttora a ricerche. Hanno lavorato nel Centro e pubblicato l'esito delle loro indagini il Dr. Ettore Vidari aiuto nell'Istituto di Anatomia Patologica di Pavia, il Dr. Cesare Cavallero assistente volontario nello stesso istituto e il Dr. Alfonso Giordano, assistente, Dr. Francesco Bordonaro, assistente interno. Il Dr. Montessori Pier-Paolo vi ha condotto a termine le ricerche per la dissertazione di laurea in medicina e chirurgia, ed altrettanto sta facendo il laureando Pier Luigi Mariani da Pavia.

* * *

Il Centro riceve da ogni parte d'Italia e del mondo ceppi fungini per lo studio la determinazione od il controllo. Ecco l'elenco degli stipiti ricevuti e studiati nei quattro anni trascorsi:

Actynomyces albus (Rossi-Doria) Gasperini (in Lehmann et Neumann. Atlas Grundr. Bakt. **2**, 383, 1896).

— ceppo isolato da una eritematosi atipica della cute del collo di un paziente, dal Prof. G. Bertaccini, Direttore della Clinica Dermosifilopatica della R. Università di Bari (stipite N. 78)(Italia).

— ceppo isolato da espettorato di un paziente bronchitico ed inviato dal Dr. Villarà del Laboratorio provinciale d'Igiene di Catania (Italia) (stipite N. 104).

— ceppo isolato da una coltura ottenuta seminando materiale di una piaga torpida in un soldato ricoverato nell'Ospedale Militare di Milano (invio del Dr. P. Provera di Milano); il micete era associato a vari schizomiceti (stipite N. 119).

— ceppo isolato da un coagulo sanguingno „in vitro", in seguito a prelievo di un paziente della Clinica Dermosifilopatica di Catania (Italia), ed inviato dal Prof. G. B. Cottini (stipite N. 123).

Actynomyces griseus Krainsky (CentBl. f. Bakter., II Abt., **41**, 649, 1914).

— ceppo isolato da colture di liquor cerebro-spinale umano in brodo-siero; inviato dal Dr. P. Provera di Milano (Italia).

Dermocystidium pusula Perez (Arch. Zool. exp., **51**, 343, 1913).

— il fungo allo stato parassitario è stato identificato in preparati istologici di noduli cutanei in *Hyla rubra* (anfibio anuro), inviato dal Prof. A. Carini dell'Istituto di Biologia di San Paolo (Brasile) (stipite N. 92).

Pericystis Betts (Ann. Botany, **26**, 795, 1912).

Il genere *Pericystis* fu descritto da Betts con la specie *P. alvei*, per il parassita che causa una grave malattie epidemica delle api, cui si aggiunse un *P. apis*, probabilmente non distinto dal *P. alvei*. Dopo la sommaria descrizione di Betts, la morfologia del fungo fu studiata da Claussen (Arbeit. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirt., **5**, Heft 3, 1921) e la citologia da Varitchak (Le Botaniste, **25**, 343—376, 1933), la quale concluse per l'inclusione nella monotipica famiglia delle Synascomycetaceae Varitchak, il cui sacco sporifero è un sinasco.

Il fungo è eterotallico e per coniugazione dei gameti + e — si forma un sacco spori-

fero multisporulato; vi è un notevole dimorfismo sessuale che si rivela persino nei imceli di segno diverso, come molto diversi sono i due gameti che si copulano. Dopo primi studi, già GAÜMANN (Comparative morphology of Fungi, I° Ed. ingl., p. 146, 1928) notava l'affinità di questo genere con le Endomycetaceae e FITZPATRICK (The lower Fungi, I° Ed., p. 312, 1930) lo poneva vicino a *Dipodascus*. Il sacco sporifero è considerato come un asco multiplo (sinasco) quale VON BÜREN (Beitr. z. Kryptogamenfl. d. Schweiz, **5**, Heft 1, 1915) aveva ammesso per le Protomycetaceae.

La ragione del nostro studio, sperimentando gli stipiti di *Pericystis* avuti dal Centraal Bureau v. Schimmelcultures di Baarn (Olanda), sta nelle analogie notevolissime tra le Coccidiaceae (e *Rhinosporidium* meglio ancora che *Coccidioides*, dati gli enormi sacchi sporiferi) e *Pericystis*, astraendo, naturalmente, dai fatti coniugativi precedenti e susseguenti alla formazione del sacco sporifero e dall'eterotallismo che vi è connesso. Oltre l'identità dei sacchi endosporulanti, anche la germinazione delle spore si accosta per *Pericystis* a quella di *Coccidioides*, ed il fatto che *Pericystis* è parassita di animali viventi ci portava ad ammettere una ulteriore analogia con le Coccidioidaceae. Anche il problema della natura chimica del sacco sporifero che è chitinica in *Pericystis apis* (e in *Ascoidea rubescens*) porta ancora ad un riaccostamento con *Coccidioides*.

In conseguenza di che le inoculazioni sperimentali furono da noi tentate in animali a sangue caldo per accertare l'eventuale potere patogeno di *Pericystis*, o quanto meno la capacità di adattarsi a tessuti di animali superiori inducendo lesioni ed acquistando aspetti parassitari eventualmente analoghi a quelli prodotti e creati da specie di *Coccidioides*.

Usando delle specie *Pericystis apis* e *Pericystis alvei*, vennero inoculati sottocute ed endoperitoneo delle cavie e dei ratti: dapprima l'inoculazione fu eseguita con i miceli + e — tenuti distinti, quindi la prova venne ripetuta inoculando contemporaneamente i due miceli di segno diverso. Gli animali reagirono al punto di inoculazione (derma e omento) con una infiammazione semplice, quale quella a corpo estraneo con la finalità di segregare e distruggere il materiale inoculato; residuarono, dopo 15 giorni, semplici noduletti connettivali dai quali non fu possibile reisolare il micete che apparve, all'esame istologico completamente distrutto.

Malgrado tali risultati negativi, d'altronde facilmente interpretabili data la diversità degli ospiti saggiati e quelli che *Pericystis* parassita, le analogie morfologiche ci fanno ritenere possibile una parentela tra queste genere e le Coccidioidaceae, considerando in via di ipotesi, *Rhinosporidium* e *Coccidioides* come generi a sessualità nulla, producenti un sacco sporigeno di origine partenogenetica e quindi ad evoluzione regressa e semplificata. Naturalmente l'interpretazione del sacco sporifero come asco multinucleato (sinasco) o come sporangio non ha valore se non per la sistemazione del micete nei quadri micologici.

Sulla base di questi dati e qualora si volesse ammettera la figliazione filogenetica tracciata dalla VARITCHAK (*Jareia*, un Sifomicete-*Pericystis*, in cui già si realizza l'emiasco, assieme a *Dipodascus Endomyces*, in cui dall'emiasco si passa all'asco tipico) le Coccidioidaceae si inserirebbero a lato delle Synascomycetaceae, quelle a sessualità ridotta e queste a sessualità completamente evoluta. Naturalmente questa ipotesi non vuole essere altro che una traccia di lavoro per le future ricerche.

Trichophyton rosaceum Sabouraud (Arch. Med. Exper. Anat. Pathol., **21**, 274—298, 1909).

— ceppo isolato da un caso di onicomicosi in diverse semine successive ed inviato

dal Prof. G. Bertaccini della Clinica Dermosifilopatica della R. Università di Bari (Italia).

— ceppo isolato da un caso di presunta micosi della cute dell'avambraccio con elementi eritematosi atipici, ed inviato dal Prof. G. Bertaccini, come nel caso precedente (stipite N. 77a), associato ad una *Torulòpsis* sp. a pigmento rosso, (stipite N. 77b).

— ceppo isolato da una lesione eritemato-squamosa della regione del polso in un bambino ed inviato dal Dr. A. Previtera da Udine (Italia) (stipite N. 85).

Achorion Schönleini (Lebert) Remak (Diagnostische u. pathogenetische Untersuchungen 193, 1895).

— ceppo isolato da una forma di „kerion" ad aspetto microscopico del pelo ricordante le forme favose; inviato con la sigla „K. R." dal Prof. Bertaccini della Clinica Dermosifilopatica della R. Università di Bari (Italia) (stipite N. 79).

Achorion quinqueanum (Zopf) Bodin (Arch. de Parasit., 5, 5—30, 1902).

ceppo isolato dal Prof. G. Bertaccini da un caso di „kerion" analogo a quello del caso precedente (stipite N. 80).

Saccharomyces cerevisiae Hansen (Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 2, 13, 1883).

— ceppo isolato da due casi di paronichia in pasticceri dal Prof. Tommasi, Direttore della Clinica Dermosifilopatica di Napoli, (stipiti N. 97 e 98). Sono questi due tipici ceppi del ben noto lievito della fermentazione alcoolica che particolarmente ci interessano per essere stati con sicurezza repertati in due casi di onicomicosi umana. Le caratteristiche colturali e morfologiche sono quelle ben note, ed identiche nei due ceppi. Biologicamente fermentano glucosio, levulosio mannosio, maltosio, saccarosio e non lattosio e galattosio. La fermentazione del raffinosio è debole e tardiva (dopo 108 ore). Le assimilazioni sono attive verso il glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio, galattosio, maltosio e raffinosio, ma in galattosio e raffinosio meno che in altri zuccheri. I substrati vengono acidificati. Manca l'assimilazione del lattosio.

— ceppo contrassegnato BLS. F. C. Genova, Società Eridania, Sampierdarena (Italia) isolato dal lievito compresso selezionato per la panificazione o lievito di melassa; è stato inviato dal Prof. Satta della R. Università di Firenze (stipite N. 44).

Caratteri colturali: in terreni solidi (agar glucosato) patina abbondante, cremosa, densa, bianca, opaca in trasparenza, lucida in superficie, finissimamente zigrinata a margini irregolari, sino a festonati e talvolta plumosi. Su terreni ricchi la colonia è piuttosto liscia salvo un orlo discontinuo finemente plumoso. In mezzi liquidi si ha formazione di una discreta quantità di fondo polveroso ed un anello incompleto. Su agar di patate, lo sviluppo è scarso e la colonia è nettamente tubercolare in superficie.

Caratteri micromorfologici: in vetrini col metodo Rivalier-Seydel si notano esclusivamente cellule gemmanti di forma sferica o sferoidea, del diametro di 5—6 μ senza accenni a vegetazioni più complesse. In agar glucosato ai margini della colonia si mostrano qua e la dei complessi arbuscolari dendroidei, costituiti da cellule ellittiche od ellittico-allungate con forme intermedie sino a quelle tipiche sferoidee. La caratteristica di *Blastodendrion* appare raramente ed è piuttosto atipica mancando di veri arbuscoli, di formazioni a corona e di cellule stalagmoidee, essendo piuttosto riferibile ad una ramificazione catenulare multipla di blastospore gemmanti.

Caratteri biochimici: le fermentazioni all'atto dell'isolamento con le modalità note (prove eseguite nei Laboratori della Sanità di Roma) davano acido e gas in glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio e maltosio; nulla in lattosio e destrina. Saggiato da noi, il micete ha mostrato sin dal primo giorno (e più intensa dopo 4 giorni) la fermentazione di glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio e maltosio; più scarsa ma sempre discre-

tamente abbondante e più tardiva (dal 2° giorno in poi) quella del mannosio; nulla in lattosio e raffinosio. Le assimilazioni delle sostanze idrocarbonate vanno di preferenza verso i monoesosi, il saccarosio ed il maltosio. Le assimilazioni di sostanze azotate indicano una abbondante assimilazione del peptone, scarsa per il nitrato di potassio, scarsissima o dubbia per l'asparagina e nulla per l'urea ed il solfato d'ammonio.

In mano nostra il ceppo, come si è indicato in precedenza, è rimasto costantemente asporigeno quale che sia stato il metodo di coltura usato, inclusi i mezzi usualmente impiegati al fine di mettere in evidenza la formazione delle spore. In tal modo eravamo giunti alla conclusione di identificare questo nostro ceppo con la *Torula* N. 6 isolata insieme a numerosi altri ceppi da Will in birrerie in Germania (Cent. Bl. f. Makter., II Abt., 46, 1916). Avendo inviato tale ceppo al Centraal Bureau f. Schimmelcultures, Yeast Division di Delft (Olanda) diretto dal Prof. A. J. Kluyver, la Dr. T. Hof, con lettera in data 12 giugno 1939 ci avvisava che nelle sue colture il ceppo produceva spore e formava un pseudomicelio da noi non osservato. In seguito a queste constatazioni noi ripetemmo le nostre osservazioni riconfermando quanto avevamo visto la prima volta, essere cioè un ceppo che sotto le condizioni di sperimentazione e con i terreni di coltura da noi impiegati, non formava nè spore nè apparate filamentoso. Allora chiedemmo alla Dr. T. Hof di confermare le sue determinazioni e questa studiosa con lettera in data 19 settembre 1940 asseriva che l'identificazione del ceppo era con il *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.

Come si vede dalle superiori argomentazioni, i pareri sono disparati: pur rimanendo da indagare il perchè di queste differenze tra i risultati dei nostri studi e quelli effettuati in Olanda (allo stesso titolo che per gli stipiti B. 45 e 46) ci sembra opportuno acettare la derminazione della Dr. Hof. Siccome d'altra parte il lievito, secondo la descrizzione di Will non si distingue dalla sua *Torula* N. 6 asporigena, ci pare ugualmente opportuno dare un binomio a questa specie che dovrebbe essere, secondo quanto ci sembra, la forma asporigena del *Saccharomyces cerevisiae*. Nella revisione dei lieviti effettuata dalla Lodder, mentre sono considerate come distintive le fermentazioni del glucosio (levulosio, mannosio), galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, non vi è nessuna specie che fermenti il glucosio (levulosio, mannosio), glaattosio, saccarosio e maltosio, come si ha nel nostro ceppo e nella *Torula* N. 6 di Will.

Assegnamo in tal modo alla forma asporigena il binomio *Torulopsis sexta* nobis n. nomen (= *Torula* N. 6 di Will) che si distingue dalla *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo sopratutto per la fermentazione del galattosio e per le assimilazioni di sostanze azotate che le comprende tutte salvo il nitrato di potassio.

Torulopsis sexta nobis, n. nomen
= *Torula* N. 6 Will (1916).

„in agaro glucosato coloniis albidis, cremosis, levibus, vel verruculosis, emarginatis vel irregularibus aud subplumosis; in fluido nutrititio, annulo et sedimento. Cellulis pro more sphaericis, 5—6 μ diam. rarius cum gemmationibus aggregatis ad instar *Blastodendrion*, sed spuriis; sine ascosporis. Fermentat glucosium, laevulosiom, mannosium, galactosium, saccharosium et maltosium; nulla in lactosio et raffinosio. Assimilat glucosium, laevulosium, galactosium, saccharosium et maltosium; minus assimilat mannosium; assimilatio nulla in lactosio et raffinosio. Assimilat peptonum; parva nitrati potassici et asparaginae assimilatio."

Habitat: in fabrica cerevisiae, Germania ed in fabrica sacchari, Italia.

Saccharomyces chodati Steiner (Etude sur les lévures actives des vins valaisans, Thèse, Genève, p. 28, 1924).

— ceppo contrassegnato BLS. C., isolato da campione di lievito naturale in Sardegna (Italia, 1937) ed inviato dal Prof. SATTA della R. Università di Firenze (stipite N. 43).

Caratteri colturali: in terreni solidi (agar glucosato), patina discretamente densa, cremosa, compatta, dapprima bianco-latte poi bianco-giallognola, splendente in superficie all'inizio, poi subopaca ed opaca in trasparenza; margini lisci vagamente festonati, talvolta in superficie molto leggermente verruculosa. Invecchiando il carattere della rugulosità si accentua. In terreni liquidi, scarso sviluppo con formazione di un deposito pulverulento e tracce più o meno accentuate di anello sino ad un anello completo dopo almeno quindici giorni.

Caratteri micromorfologici: in agar glucosato cellule gemmanti (generalmente per gemmazione unipolare) di forma elissoidea od ovato-ellittica, regolari e discretamente isodiametriche, di 6—8 × 3—4 μ, non aggregantisi, senza tracce di pseudomicelio. In agar GORODKOWA non si è osservata sporulazione. Discretamente abbondante la sporificazione è avvenuta dopo 15 giorni di sviluppo in microcolonie su vetrini portaoggetti secondo il metodo di RIVALIER-SEYDEL. Gli aschi sono di forma ellittica od ovato-ellittica e non si distinguono per dimensioni dalle ordinarie blastospore. Gli aschi paiono formarsi senza previa copulazione; ognuno d'essi contiene in media due spore, raramente tre e molto raramente una. Le spore sono sferiche o sferoidee, del diametro di 3,5—4 μ a membrana liscia; lo stesso reperto si ha in agar di patata con formazione di rari aschi bispori.

Caratteri biochimici: le fermentazioni saggiate all'atto dell'isolamento (eseguite nel Laboratorio della Sanità, Roma) mostrarono produzione di gas e acido in glucosio, levulosio, galattosio e saccarosio; sola produzione di acido in maltosio; nulla in lattosio e destrina. Saggiato da noi si rivelò già dopo 24 ore una fortissima fermentazione del glucosio, levulosio e saccarosio, ed una forte fermentazione del mannosio e del maltosio; dopo 48 ore fermentava anche il galattosio. Le assimilazioni delle sostanze idrocarbonate si sono mostrate molto evidenti di fronte al galattosio, saccarosio e maltosio, discrete di fronte al glucosio e levulosio, scarse di fronte al mannosio ed al lattosio, nulla di fronte al raffinosio. Le assimilazioni delle sostanze azotate si sono dimostrate attive di fronte al peptone, scarse di fronte ai nitrati, dubbia quella dell'asparagina mentre nulla è stata l'assimilazione di urea e di solfato d'ammonio.

Questo ceppo coinciderebbe eccellentemente per tutte le caratteristiche colturali micromorfologiche e biochimiche con il *Saccharomyces Chodati* Steiner isolato una sola volta in Svizzera da mosto di vino in fermentazione, salvochè per l'assimilazione dei nitrati, negativa secondo STELLING-DEKKER (Di sporog. Hefen, p. 176, 1931) e positiva per il nostro ceppo. Data però la completa concordanza di ogni altra caratteristica non ci pare opportuno basare su quest'ultima differenza una possibile individualità del ceppo in studio.

Hansenula javanica (Groenewege) Stelling-Dekker (Die Sporogenen Hefe, p. 427, Amsterdam, 1931).

— ceppo contrassegnato BLS. N. 3, isolate da campione di lievito naturale in Sardegna (1937) (Italia); il lievito è costituito da un impasto di farina che si preleva ogni 15—20 giorni quando si prepara il pane; inviato dal Prof. SATTA della R. Università di Firenze. (stipite N. 45).

Caratteri colturali: colonia molto abbondante, patina densa, cremosa, inizialmente bianca, poi bianco-gialliccia; la parte centrale è soprelevata e piana, regolarmente verruculosa, la parte periferica è degradante sino ai margini, liscia o leggermente striata nel senso del raggio; margini mammellonati lisci, continuantisi alla periferia con raggiera di irregolari plumosità che si addentrano nel substrato. Superficie poco lucida, coltura opaca in trasparenza. In terreni liquidi non si ha formazione di anello; sul fondo poco materiale pulverulento, talora sottilissimi veli in superficie.

Caratteri micromorfologici: blastospore polimorfe, rotonde, ovalari, allungate, isolate od in piccole catene o ad alberello, abbondantemente gemmanti; nello colture giovani, assenza di apparato filamentoso che manca anche nelle culture alla Rivalier-Seydel. Invece nelle vecchie colture in agar glucosato ed in agar di patate, ampio apparato filamentoso con verticilli di blastospore del tipo *Mycocandida*, *Mycotorula* e *Mycotoruloides*. Il reperto è particolarmente visibile nelle piastre a sottile strato di agar.

Caratteri biochimici: le fermentazioni saggiate all'atto dell'isolamento (nei Laboratori della Sanità, Roma) sono state positive (con produzione di acido e gas) in glucosio, levulosio, galattosio, maltosio e saccarosio; nulla in lattosio e destrina. Le stesse fermentazioni da noi ripetute sono state positive (con produzione di acido e gas) in glucosio, levulosio, mannosio, maltosio e saccarosio. Come si vede vi è una discrepanza fra i nostri reperti e quelli citati in precedenza, nel senso che da noi il ceppo non ha prodotto gas in galattosio mentre il reperto fu positivo nelle mani del laboratorista di Roma; il fenomeno non è facilmente spiegabile. Le prove di assimilazione hanno dato: ottima assimilazione del carbonio da glucosio e saccarosio, minore da levulosio e galattosio, scarsa da maltosio e mannosio, dubbia da lattosio e raffinosio. L'assimilazione dello azoto fu abbondante dall'asparagina, dall'urea e dal peptone, scarsa dal solfato d'ammonio, dubbia dal nitrato potassico.

Anche questa specie, in mano nostra, apparve asporigena e nelle sue caratteristiche fondamentali coincideva bene con quelle della *Mycotorula lambica* (Kufferath) Harrison (Transact. Roy. Soc. of Canada, Biol. Sci. ser. III, **22**, parte seconda, sez. V., p. 220, 1928) (= *Torula lambica* Kufferath, Vol. Jub. du centain. Soc. Royal Sci. Med. et Natur., Bruxelles, 1922—1923), isolata dalla birra nel 1922 da Kufferath in Belgio (vedi anche Chimie ed Industrie, **13**, 890, 1925). La specie venne ristudiata sulla coltura originale da Harrison e quindi riesaminata dalla Lodder (Anaskosporogenen Hefen, I°, p. 50, 1934) che in colture col metodo Rivalier-Seydel osservò la produzione di blastospore con figurazioni di *Mycotoruloides*. Le sole caratteristiche differenziali si manifesterebbero nelle attività biochimiche in quanto Harrison avrebbe osservato una debolissima fermentazione del galattosio che manca del tutto nel nostro ceppo (per quanto il reperto apparve positivo nelle prove di fermentazione eseguite a Roma).

Un trapianto di questo stipite, inviato per controllo al Centraal Bureau v. Schimmelcultures East Division di Delft (Olanda), in mano alla Dr. T. Hof produsse delle spore a forma di cappello (lettera del 12 giugno 1939); a nostra richiesta la studiosa, in base alla forma delle spore, alla assimilazione del nitrato potassico ed alla produzione di velo su malto, concluse per l'identificazione del ceppo con la *Hansenula Javanica* (Groenewege) Dekker. L'unica differenza tra un ceppo tipico di questa specie ed il nostro N. 45 si ha nel fatto che il velo non è molto pronunciato, ciò che però può aversi anche per altri tipi di *Hansenula javanica*.

Se veramente la *Mycotorula lambica* si a la forma asporigena dell'*Hansenula javanica* non potremmo asserire pur avendo qualche presunzione in merito.

Histoplasma capsulatum Darling (J. American Med. Assoc., **46**, 1238, 1906).

Nell'ultimo nostro contributo sperimentale per chiarire la genesi della forma animalizzaa del fungo sostenitore della reticolo-endotelite sistematica umana e degli animali (Arch. Ital. Medic. Sperim., **1**, 1, 1937) non abbiamo accennato ad alcune difficoltà insorte in questi ultimi tempi alla riproduzione della istoplasmosi perimentale mediante la colture ifomicetiformi di *Histoplasma capsulatum* Darling (culture del tipo III). Non potendo riottenere le colture lievitiformi del I° tipo (è noto il dimorfismo colturale di queste micete) con le quali sembra essere più facile ottenere nella cavia nel ratto e nel coniglio la malattia sperimentale, perchè ci mancava il materiale patologico

adatto, abbiamo tentato di produrre queste colture lievitiformi coltivando il fungo nella sua forma ifomicetica a 38°C. e su terreni al sangue ed al siero umano e di coniglio; abbiamo ottenuto solo delle colture parzialmente lievitiformi, prevalentemente con gli aspetti delle forme di passaggio (secondo tipo); queste colture si sono tuttavia dimostrate inattive nella genesi della malattia sperimentale. Abbiamo pensato che la permanenza dell'*Histoplasma capsulatum* in coltura potesse avere influenzato la sua biologia nei riguardi di una diminuzione della virulenza per i tessuti animali viventi.

Nell'intento di chiarire il fenomeno, abbiamo riottenuto dal Prof. De Monbreun che gentilmente ha voluto favorirceli, nuovi trapianti del ceppo originale da lui isolato nel 1934 (dal caso di Dodd e Tompkins) sia nelle colture ifomicetiche come in quelle lievitiformi; egli ha conservato questo tipo di colture passando sistematicamente il micete nel peritoneo del ratto e coltivandolo successivamente in agar sangue. De Monreun ci ha inviato anche uno stipite di *Histoplasma capsulatum* agente della malattia spontanea del cane.

Con questi due stipiti abbiamo ritentata la riproduzione della malattia sperimentale nella cavia, ratto e cucciolo che tanto facilmente era stata ottenuta durante le nostre ricerche dal 1934 al 1937; ma anche con questi stipiti le lesioni provocate non rivestirono la forma sistematica interessante le stazioni principali del sistema reticolo-istiocitario, bensì si ebbero solo delle lesioni locali di tipo granulomatoso con scarsissimo reperto di blastospore endoistiocitarie. Questi fatti non erano facilmente spiegabili: conoscendo le analogie tra la istoplasmosi di Darling e la leishmaniosi viscerale sopratutto dal punto di vista della biologia degli agenti ed della patogenesi delle malattie, in mancanza di criceti e di spermofili di Macedonia, animali particolarmente recettivi alla *Leishmania donovani*, abbiamo tentato su animali affini; pertanto sono stati inoculati per vie diverse scoiattoli, donnole, ricci ; ma i risultati furono sempre negativi nei riguardi della riproduzione di una malattia sistematica.

Un ulteriore serie di ricerche è stata condotta procedendo alla reinoculazione periodica degli animali (cavie, conigli, ratti, ricci) con le colture lievitiformi e ifomicetiformi nella speranza di modificare specificamente la recettività degli animali inducendo condizioni di iperrecettività alla infezione. Ma anche questi tentativi non ebbero esito positivo. Ci resta pertanto ancora da spiegare questo insuccesso sperimentale: l'unica differenza rilevabile tra i reperti ampiamente positivi ottenuti negli anni 1934 e 1935 e quelli quasi negativi del 1939 e 1940 è che i primi gli esperimenti sono stati eseguiti a Catania (Sicilia) ed i secondi a Pavia; ma non sapremmo però dar valore alle questioni climatologiche per giustificare i nostri reperti.

Sono in corso esperimenti per controllare le recenti affermazioni di Negroni circa la possibile produzione di colture lievitiformi di *Histoplasma capsulatum* con procedimenti esclusivamente „in vitro".

Sporobolomyces shibatanus (Okonuki) Verona et Ciferri (Mycopathologia, **1**, 163, 1938) (per descrizione completa vedi Verona O. e Ciferri R., Atti Istit. Bot. R. Univ. di Pavia, serie IV, **10**, 241, 1938).

— ceppo isolato dal Prof. G. Goidànich da pasta di legno in Italia (stipite N. 21) (per la letteratura su questo ceppo vedi a proposito della *Mycotorula zeylanoides*).

Sporobolomyces salmonicolor (Fischer et Brebeck) Kluyver et Van Niel, var. *typicus* Cif. et Ver. (per la letteratura vedi la specie precedente).

— ceppo isolato come il precedente (stipiti B. 22 e 23).

Sporobolomyces Sp.

— ceppo isolato da inquinamento di brodo glucosato nel Centro di Micologia umana e comparata di Pavia (Italia) (stipiti N. 63 e 64).

Torulopsis candida (Saito) Lodder (Die anaskosporogene Hefen, I, 164, 1934).

— ceppo isolato dal materiale patologico di una dermatite cronica erosiva superficiale della guancia con metastasi al dorso in una signora di Tripoli; inviato dal Prof. Tommasi di Palermo (stipite N. 9b); il fungo era associato ad un ceppo di *Aerobasidium pullulans* (stipite N. 9a) e ad un *Hormodendron* sp. (stipite N. 9c); trattasi evidentemente di una forma di associazione micosica nella quale non è stato possibile definire la funzione patogenetica delle singole specie isolate.

Torulopsis albida (Saito) Lodder(Die anaskosporogenen Hefen, I, 162, 1934).

— ceppo isolato da pasta di legno in Italia dal Prof. G. Goidànich (stipiti N. 16 e N. 17) (per la letteratura vedi a proposito della *Mycotorula zeylanoides*).

Torulopsis minor (Pollacci et Nannizzi) Lodder (Die anaskosporogenen Hefen, I, 179, 1934).

— ceppo isolato come il precedente (stipite N. 19).

Torulopsis flavescens (Saito) Lodder (Die anaskosporogenen Hefen, I, 166, 1934).

— ceppo contrassegnato K. BLS. N. 1, isolato da campioni di yoghourt (giuncheta e giuddu sardi) ed inviato dal Prof. Satta della R. U. di Firenze e proveniente dai Laboratori della Sanità Pubblica di Roma. (stipite N. 40).

Caratteri colturali: in terreni solidi (particolarmente in agar gluccosato), coltura non molto abbondante, sviluppata lungo lo striscio, patina sottile, piana, liscia o lievemente e regolarmente mammellonata in ogni caso sempre lucente, margini semplici, lisci o circondati da poche coloniette secondarie. Alla lente i margini sono completati all'esterno da una fascia sottilissima, semitrasparente. Il colore delle patine è brunogiallastro sino ad ocraceo, scuro e sporco nelle colture vecchie.

Caratteri micromorfologici: in terreni solidi e liquidi, cellule per lo più ovalari, più raramente rotonde; di solito mostrano numerose gemmazioni isolate o riunite in catenelle di 2—3 elementi; raramente si formano piccoli complessi ad alberello. Rarissime sono le forme allungate a bastoncino. Dimensioni (in brodo glucosato) 3.5 × 6, 4 × 6.5, 2.5 × 5; in agar glucosato 2.5 × 5—6, 3 × 6—6.5; assenza di apparato filamentoso, talora cellule grandi, chiare, del tipo clamidospora; assenza di aschi. Non osservate forme in coniugazione.

Caratteri biochimici: fermentazione degli idrati di carbonio accertata all'atto dell'isolamento su acqua peptonata con l'aggiunta del 2% di zucchero e come indicatore la tintura di tornasole (Laboratori della Sanità, Roma): negativa per glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, destrina; acidifica il levulosio. Le fermentazioni eseguite dopo alcuni mesi dall'isolamento (osservazione personale) negative in glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio e raffinosio. Assimilazione degli idrati di carbonio: discreta per glucosio, levulosio e mannosio; scarsa per maltosio, saccarosio, lattosio e raffinosio; delle fonti di azoto è apparsa chiara l'assimilazione del peptone, scarsa o nulla quella del solfato d'ammonio, dell'asparagina, urea, nitrato di potassio.

— ceppo contrassegnato K. BLS. N. 2, isolato da campioni di Yoghourt, come il precedente (stipite N. 41). Per ogni carattere non si differenzia dallo stipite N. 40; solo per i caratteri biochimici notiamo che esso acidifica il saccarosio anzichè il levulosio.

— ceppo contrassegnato K. BLS. N. 3, isolato da campioni di Yoghourt, come il ceppo N. 40 (stipite N 42). Per i caratteri colturali e micromorfologici non si differenzia

dagli stipiti N. 40 e 41; per i caratteri biochimici risulta acidificare il maltosio anzichè il lattosio o il saccarosio.

I tre stipiti N. 40, 41 e 42 praticamente indistinguibili tra di loro, coincidono bene con la *Torulopsis flavescens* (Saito) Lodder (Die anaskospor. Hefen, I°, p. 165, 1934) per ciò che è noto isolata una sola volta dall'aria in Giappone. Le differenze vertono soltanto sulle assimilazioni delle fonti di azoto per cui mentre i nostri ceppi assimilano quasi esclusivamente il peptone, il ceppo originale assimila ugualmente bene peptone, asparagina e solfato d'ammonio, ma non il nitrato di potassio e questa esclusione da noi confermata è molto significativa. La presenza di queste micete, nuovo per l'Italia, in campioni di Yoghourt deve ,con ogni probabilità, ritenersi puramente accidentale.

Mycotorula albicans (Robin) Lang. et Tal. (Ann. Parasit. hum. comp., **10**, 47, 1932).

— ceppo „levure Reboul" isolato dal Dr. L. Grigoraki da espettorato di bronchitico ed inviato dallo stesso da Marsiglia (Francia) (stipite N. 7).

— ceppo isolato da un caso di enteroepatite infettiva del tacchino e descritto come nuova specie con il binomio *Cryptococcus meleagris* Bisbocci (Nuovo Ercolani, estratto, 1938). E' dunque questo un nuovo sinonimo che viene ad aggiungersi alla lista di quelli già numerosi da noi elencati (confronta Ciferri R., Redaelli P. e Cavallero C., Mycopathologia, **1**, 115—161, 1938) (stipite N. 61).

— ceppo isolato dal Prof. T. Castelli da un campione di lievito da panificazione per uso domestico ad Ascoli Piceno (Italia) ed a Perugia (Italia). Dato lo speciale interesse offerto dal sustrato d'isolamento e le considerazioni d'indole epidemiologica che ne derivano, questo ceppo è stato descritto e studiato in altra pubblicazione (Redaelli P. Castelli T. e Ciferri R., Mycopathologia **1**, 182—184, 1938) (stipite N. 62).

— ceppo isolato da un caso di micosi polmonare (bronchite con broncopolmonite associata a cancro bronchiale) dal Prof. F. Cortese in Cremona (Italia); è apparso un tipico ceppo di *M. albicans* (stipite N. 81).

— ceppo isolato dall'espettorato di un caso di bronchite cronica (pseudotubercolosi) in un uomo reduce dall'Africa Orientale Italiana (ha vissuto per 10 anni nell'Harrarino), per due volte ed in condizioni di asetticità del cavo orale; il paziente curato con preparati iodo-arsenicali ha visto migliorare le condizioni generali con riduzione delle ombre radiologiche infiltrative polmonari; case del Prof. U. Carpi di Milano (Italia). (stipite N. 112).

— ceppo isolato da carote marcescenti per opera della *Sclerotinia sclerotiorum* (Massee) Lib. e del *Bacillus carotovorus*, in Pisa (Italia). Il caso è stato pubblicato da O. Verona e R. Ciferri (Mycopathologia, **1**, 273, 1939).

Mycotorula trimorpha Cif. et Red. (Arch. f. Mikrobiol., **6**, 35, 1935).

— ceppo inviato dal Dr. L. Grigoraki, sotto il nome di „levure Brahic" ed isolato da un espettorato di bronchitico in Marsiglia (stipite N. 8).

Mycotorula guilliermondi (Cast.) Cottini et Redaelli (Mycopathologia, **2**, 77, 1939).

— ceppo isolato da un caso di „lingua nigra et pilosa" a Catania (Italia) (stipite N. 8); il caso è stato compiutamente descritto da Cottini G. B. (Mycopathologia, **2**, 75—79, 1939) e nello stesso lavoro sono indicate le caratteristiche del lievito.

— ceppo isolato da una lesione ulcerosa superficiale ad un piede, inviato dal Prof. Latteri (Clinica Chirurgica di Messina, Italia) (stipite N. 13c), associato al *Geotricum candidum* (stipite N. 13a) e ad un *Cephalosporium* sp. (stipite N. 13b).

— ceppo sontrassegnato BLS Roma, isolato dal lievito compresso selezionato fresco o lievito di melassa, inviato dal Prof. SATTA della R. Università di Firenze (stipite N. 46).

Caratteri colturali: in terreni solidi, patina abbondante, piana e sottile, di colorito giallastro sporco; superficie liscia e lucente, margini un poco ispessiti, quasi circinati, ampiamente festonati; dai margini e dalla superficie inferiore si addentrano nel substrato formazioni arborescenti e plumosità irregolari. In agar di patate, sviluppo più compatto e più scarse plumosità. In terreni liquidi scarso sviluppo, assenza di anello, discreto fondo pulverulento con accenni a fiocchi di vegetazione filamentosa.

Caratteri micromorfologici: blastospore generalmente globose, rotonde ma più frequentemente un poco ovalari; in terreni liquidi maggior frequenza di forme allungate, bastonciniformi, raramente isolate, per lo più riunite a formare catenelle, rosette, alberelli gemmanti, complessi vari derivati da gemmazioni successive. Dimensioni 3 × 7.5, 3.5 × 6, 3 × 6, 2.5 × 5; nelle vecchie colture in agar glucosato formazione di apparato filamentoso con vegetazioni del tipo *Mycocandida* e *Mycotorula* piuttosto degratate morfologicamente; col metodo Rivalier-Seydel non si ha formazione di apparate filamentoso. Assenza di aschi e di ascospore.

Caratteri biochimici: le fermentazioni saggiate all'atto dell'isolamento sugli stessi terreni e con le modalità in uso presso i Laboratori della Sanità, Roma, sono state positive (produzione di acido e gas) in glucosio, levulosio e saccarosio; si è avuta acidificazione senza formazione di gas in galattosio, maltosio, lattosio e destrina. Le nostre osservazioni hanno portato alla formazione di acido e gas in glucosio, levulosio, mannosio e saccarosio; nulla in maltosio, galattosio, lattosio e raffinosio. L'assimilazione del glucosio e del saccarosio era abbondante, meno quella del levulosio e del mannosio, scarsa o dubbia quella del maltosio, galattosio, lattosio e raffinosio.

Mycotorula kephir (Beijerink) Harrison, 1928 (Trans. R. Soc. Canada Biol. Sci., 22, 187—225, 1928).

— ceppo contrassegnato G. BLS N. 1, isolato da campioni di Yoghourt a Nuoro (Sardegna, Italia) nei tipi locali di „giungheta" e „gioddu", inviato dal Prof. SATTA della R. Università di Firenze (stipite N. 37).

Caratteri colturali: in agar glucosato dopo 60 giorni, colonia bianca a trasparenza subopaca sino a quasi alabastrina, poi giallognola, superficie splendente, regolare, a margini ampiamente lobati sino a seghettati, orlati di una sottile frangia estendentesi nell'agar e composta di elementi pseudomiceliali che penetrano modicamente in profondità. In mezzi liquidi formazione di scarso fondo e di coloniette superficiali accennati ad un anello incompleto.

Caratteri micromorfologici: nei diversi sustrati, discreto polimorfismo, cellule rotonde, ovali, sottilmente allungate, isolate o riunite in piccole catene od alberelli gemmanti e rosette. Dimensioni (in brodo glucosato) 3 × 4, 3 × 4.5, 2.5 × 4 μ, ecc. Le caratteristiche del genere *Torulopsis* si mantengono a lungo in colture diverse ed anche con accenni al tipo *Blastodendrion*. In coltura alla RIVALIER-SEYDEL, dopo 15 giorni, appariscono solo blastospore generalmente rotondeggianti in colonie più o meno grandi. Le colture su agar molto vecchio mostrano quadri di *Mycotorula*, con aspetti anche di *Mycotoruloides* e di *Mycocandida*, piuttosto degradati e rudimentali.

Caratteri biochimici: fermentazione accertata all'atto dell'isolamento (osservazioni eseguite nei Laboratori della Sanità, Roma) con acidificazione e formazione di gas in glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio e lattosio; non acidifica nè forma gas in maltosio e destrina. Le fermentazioni accertate alcuni mesi dopo l'isolamento (osservazioni personali) hanno dato attiva fermentazione (gas e acido, dopo 24 ore e dopo 4 giorni) in glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio e lattosio; il raffinosio mostra una debolissima fermentazione solo dopo 4 giorni; nulla in maltosio. Il ceppo assimila abbondantemente il glucosio, galattosio, e saccarosio; discretamente il levulosio, mannosio ed il lattosio; scarsamente il maltosio ed il raffinosio; assimila abbondantemente soltanto il peptone, delle fonti azotate; non assimila asparagina, urea, solfatto ammonico e nitrato potassico.

— ceppo contrassegnato G. BLS. N. 2, isolato da campioni di Yoghourt; analogamente al precedente (stipite N. 38). Per i caratteri colturali e micromorfologici è identico allo stipite N. 37; per i caratteri biochimici si differenzia soltanto per la completa assenza di potere fermentativo verso il raffinosio. Nei riguardi dell'assimilazione delle sostanze idrocarbonate, assimila abbondantemente il galattosio e scarsamente il mannosio, lattosio e raffinosio.

— ceppo contrassegnato G. BLS. N. 3, isolato da campioni di Yoghourt, analogamente al precedente (stipite N. 39). Per caratteri colturali e micromorfologici identico ai ceppi B. 37 e N. 38; per quelli biochimici si differenzia in quanto il maltosio non è fermentato dopo 24 ore, ma vi sono tracce di fermentazione dopo 48 e 96 ore; il raffinosio è molto scarsamente fermentato dopo 96 ore. In relazione alle assimilazioni delle sostanze idrocarbonate, assimila mediocremente glucosio e raffinosio, scarsamente mannosio e lattosio; molto scarsamente il maltosio.

I tre stipiti N. 37, 38 e 39 isolati da uno stesso sustrato, non differiscono fra di loro se non per la fermentazione del raffinosio che, assente in uno dei ceppi (N. 38), è scarsissima negli altri due. Uno solo dei ceppi (N. 39) fermenta molto scarsamente anche il maltosio Data la perfetta identità di essi stipiti è evidente che la fermentazione di questi due zuccheri è un carattere oscillante che di solito però non è manifesto. Comparando queste caratteristiche con quelle indicate da Harrison (1928) per i lieviti del genere *Mycotorula* (al quale appartengono anche i nostri tre ceppi) del gruppo I° fermentante monosaccaridi, saccarosio, lattosio ed inulina, si constata che i ceppi stessi possono riportarsi tanto alla *Mycotorula lactosa* che alla *Mycotorula Kefyr* differenti l'una dall'altra soltanto per la fermentazione dell'inulina, carattere posseduto dalla *M. lactosa* ma che mancherebbe nell'altra specie; per tali ragioni ci sembra opportuno riferire i nostri tre ceppi alla *Mycotorula Kefyr* reidentificando cor questa anche la *M. lactosa*.

Mycotorula Kefyr (Beijerink) Harrison, 1928.

= *Saccharomyces Kefyr* Beijerink 1889 fide Guilliermond et Tanner, 1919.
= *Torula Kefyr* Beijerink, 1889; Hainz et Cohn, 1908 fide Guilliermond et Tanner, 1919.
= *Torulopsis Kefyr* Lodder, 1935.
= *Torula lactosa* Kluyver?
= *Blastodendrion* sp. Lodder, 1934.
= *Mycotorula lactosa* Harrison, 1928.
= *Candida Kefyr* Westerdijk, 1934.

La Lodder (1934) studiò il ceppo autentico di Beijerink già ristudiato anche da Harrison, notando che, malgrado sieno visibili in coltura delle pseudoife miceliche allungate, manca il quadro caratteristico della *Mycotorula*; riportò in tal modo la specie al genere *Torulopsis*. Poichè nelle altre caratteristiche i nostri tre ceppi corrispondono sufficientemente bene con le caratteristiche indicate da Harrison e da Lodder, micromorfologia a parte, è molto probabile che questo lievito nella prolungata vita di coltura tenda a ridurre sempre più l'apparato filamentoso trasformandosi in Torulopsoidea. Di ciò abbiamo una prova anche nei ceppi di recente isolamento e da noi studiati nei quali la produzione dell'apparato filamentoso è tardiva, cosicchè uno studio non sufficientemente prolungato di questa specie porterebbe a reperti di *Torulopsis* invece che di *Mycotorula*.

Benchè con maggiori dubbi è probabile debbano ascriversi a questa stessa specie, od avvicinarsi ad essa come entità sottospecifiche, altre specie isolate dal latte o da pro-

dotti derivati da esso, come la *Torula spumosa* Harrison, 1927 che differisce dalla *M. lactosa* per minori caratteristiche tra le quali una turbolenta fermentazione del mosto di birra e del latte e la mancanza di fermentazione del galattosio; la *Torula lactophyla* Harrison, 1927 che differisce dalla *M. lactosa* ancora per la mancata fermentazione del galattosio, ma da una diversa reazione col latte. Con ogni probabilità anche il *Saccharomyces lactis* Adametz, 1889 (= *Torula lactis* Hainz et Cohn, 1908), che forse è pure una Mycotoruloidea, nonchè il „lievito di Keiser" fermentante il lattosio, sono da riferire a questa stessa specie. Più complessa invece è la posizione del *Lactomyces inflans caseigrana* Bochicchio, 1894 di molto difficile reidentificazione. [1])

Mycotorula pseudotropicalis (Castellani) nobis, n. comb.

— due ceppi isolato da una dermatosi (caso Suchelli) in Pavia (Italia) dal Prof. G. Falchi (stipiti N. 10 e N. 12).

I due ceppi sono identici tra di loro e si riportano perfettamente alla specie che descrivemmo come *Candida mortifera* Redaelli (P. Redaelli, I miceti come associazione microbica nella tubercolosi polm. cavitaria, ecc., p. 26—27, Pavia, 1925) insieme ad una varietà * (ibidem, p. 38). Riportata a *Mycocandida mortifera* da Langeron e Talice (1932) è stata recentemente inclusa da Langeron e Guerra (1938) nella *Candida pseudotropicalis*. Accettando il riferimento della specie, d'accordo con le idee da noi espresse circa la necessità di mantenere il nome generico di *Mycotorula* contro quello di *Candida* (Mycopathologia, 2, 73—74, 1939), riportiamo detta specie come *Mycotorula pseudotropicalis*. Tenendo in considerazione la sinonimia da noi proposta (Ciferri R. e Redaelli P., Arch. f. Mikrob., 6, 15—16, 1935), quella di Verona O. e Malaguzzi-Valeri O. (Mycopathologia, 2, 80—83, 1939) e quella di Langeron M. e Guerra P. (Ann. de Parasitol. hum. comp., 16, 464—467, 1938), questa può essere così riassunta:

Mycotorula pseudotropicalis (Castellani) nobis, n. comb.
= *Endomyces pseudotropicalis* Cast., 1910.
= *Cryptococcus sulphureus* Beauverie et Lesieur, 1912.
= *Monilia pseudotropicalis* Cast. et Chalm., 1913.
= *Atelosaccharomyces pseudotropicalis* F. de Mello et Gonzaga Fernandes, 1918.
= *Candida pseudotropicalis* Berkhout, 1923.
= *Candida mortifera* Redaelli, 1925.
= *Cryptococcus kartulisi* Cast., 1928.
= *Myceloblastanon pseudotropicale* Ota, 1928.
= *Monilia sulphurea* Vuillemin, 1931.
= *Candida pseudotropicalis* Basgal, 1931.
= *Myccocandida mortifera* Lang. et Tal., 1932.
= *Blastodendrion procerum* Zach., 1934.
= *Mycoderma sulphureus* Dodge, 1935.
= *Castellania pseudotropicalis* Dodge, 1935.

[1]) Nota: i ceppi N. 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, furono indagati, rispetto le fermentazioni, dal Prof. E. Satta della R. Università di Firenze e le fermentazioni stesse furono controllate da noi, riscontrandosi essere identiche salvo la piccola differenza per il ceppo N. 46 di cui si discorre a proposito della *Mycotorula Guilliermondi*. Tutti questi ceppi sono stati studiati per conto del Laboratorio dell'Istituto di Sanità Pubblica del Ministero dell'Interno, Diretto dal Prof. Marotta. Alcuni di tali ceppo sono stati usati dal Prof. E. Satta per uno studio dell'apporto di Vitamina B 1 nel pane da parte dei lieviti (Annali d'Igiene, 28, estratto pp. 1—17, 1938).

= *Castellania kartulisi* Dodge, 1935.
= *Pseudomycoderma Mazzae* Dodge, 1935.

Mycotorula krausi (Ota) nobis, n. comb.

— ceppo isolato dal Prof. T. Castelli da un campione di lievito da panificazione per uso domestico in Ascoli Piceno (Italia). Una descrizione di questa specie previamente nota soltanto dallo studio di Ota (Dermat. Wochschr., 78, 229, 1924) è stata pubblicata da Redaelli P., Castelli T. e Ciferri R. (Mycopathologia, 1, 183, 1938). Ancorchè questa specie sia stata il tipo del genere *Blastodendrion* quale fu definito da Ota (ma non da Langeron e Talice, 1932, che prescelsero invece il *B. intermedium* Cif. et Ashf.), giuste le idee nostre ed ormai generalmente accettate di rifondere le specie presentanti un rudimentale apparato sporifero del tipo *Mycotorula* (*Candida*) in questo genere, ci sembra opportuno ereare la combinazione

Mycotorula Krausi (Ota) nobis, n. comb.
= *„Pferdehefe II"* Ota, 1924.
= *Cryptococcus Krausi* Ota, 1924.
= *Blastodendrion Krausi* Ota, 1924 (Dodge, Med. Mycol., 233, 1935).
= *Parendomyces Krausi* Dodge, 1935.

Questa specie rientra in quello che Langeron e Guerra hanno chiamato „gruppo azimatico" distinguendosi dalle altre specie [1]) da loro incluse nel gruppo [*Mycotorula zeylanoides* (Cast. emend. Shaw) Red. et Cif. 1935; *Mycotorula deformans* (Zach) nobis, n. comb. (= *Pseudomonilia deformans* Zach, 1934, = *Candida deformans* Langeron et Guerra 1938)] per la morfologia ridotta e rudimentale senza vere ife miceliche o pseudomiceliche ma con corone ramose e con rami dendroidi ed arbuscolari. Dal punto di vista biochimico è incapace di fermentare con produzione di gas, mentre acidifica fortemente soluzioni di glucosio, levulosio, galattosio, mannosio, maltosio e saccarosio; ma non il lattosio. Non assimila nitrati e nitriti, molto scarsamente il solfato d'ammonio, scarsamente l'urea e bene il peptone. Non liquefà la gelatina.

Mycotorula chalmersi (Castellani) nobis, n. comb.

— ceppo isolato da una faringite grave con sospetto reperto di bacillo difterico, in Milano (Italia) dalla infermiera della Croce Rossa Rachele Maga (stipite N. 87b); il ceppo era associato ad un *Geotrichum candi dum* (stipite 87a). Il ceppo è tipico per la specie quale è stata redescritta da Langeron e Guerra (Ann. parasitol. hum. comp., 16, 471, 1938), al cui lavoro rimandiamo anche per la sinonimia.

Mycotorula messanensis nobis, n. sp.

— ceppo isolato dal Dr. Pisacane (Clinica dermosifilopatica di Messina, Italia) da una dermatosi (stipite N. 91).

Caratteri colturali: colonia gigante in agar glucosato dopo 20 giorni a temp. ambiente, rotonda, bianca, del diam. di poco più di un centimetro, piana e liscia in superficie che appare anche lucente; mostra un'ampia zona centrale modicamente depressa rispetto ad un alone perferico modicamente soprelevato ma degradante ai margini che sono finemente dentellati e striati regolarmente secondo il raggio. In terréni liquidi (sustrati

[1]) Nota: In realtà le specie del „gruppo azimatico" sono tre, ma non ci pare opportuno includere nella discussione la terza che è un tipico *Geotrichum* [*G. suaveolens* (Lindner) Ciferri = *Sachsia suaveolens* Lindner, 1898] che è un fungo completamente ed esclusivamente artrosporeo e come tale non rientra nei lieviti in parte o totalmente blastosporei.

zuccherati per le fermentazioni), scarso sviluppo di carattere finemente polveroso al fondo; assenza di anello e di veli.

Caratteri micromorfologici: tanto nei terreni solidi come in quelli liquidi, blastospore rotonde o lievemente ovalari, di dimensioni medie (3.5 μ di diam. 3.5 × 4 μ, oppure 4—5 μ di diam.) a struttura omogenea, riunite in brevi catenelle e in piccole rosette con rudimentale apparato filamentoso e verticilli di blastospore del tipo *Mycotorula* molto degradata. Nei vetrini allestiti col metodo Rivalier-Seydel, l'apparato filamentoso che si sviluppa perifericamente alla colonia è molto scarso per quanto raggiunga per la disposizione dei verticilli di blastospore le caratteristiche tipiche del genere *Mycotorula*; anche qui tuttavia la vegetazione è molto semplice ed oseremmo dire anche degradata rispetto alle *Mycotorula* rigogliose.

Caratteri biochimici: la fermentazione degli idrati di carbonio (metodo delle grandi fermentazioni) è piuttosto tardiva; sono fermentati con produzione di acido e di gas, il glucosio, levulosio e (molto scarsamente) il mannosio. Analogamente sono bene assimilati il glucosio ed il levulosio, scarsamente il maltosio, il mannosio, il saccarosio, il lattosio ed il galattosio; nulla l'assimilazione del raffinosio. In questi terreni zuccherati è stata evidente l'acidità in glucosio, mannosio, levulosio, saccarosio; scarsa in maltosio e galattosio; nulla in lattosio e raffinosio. Non sono conosciute le attività patogenetiche.

La morfologia di questa specie si accosta molto a quella della *Candida Flareri* (Red. et Cif.) Langeron et Guerra, quale è pubblicata da questi ultimi due Autori sul *Blastodendrion Flareri* Cif. et Red., 1935. In effetto le colonie sono quasi simili con filamentizzazione periferica scarsissima o nulla, con colture in mezzi liquidi molto limitate, con filamentizzazione tardiva in preparati alla Rivalier-Seydel, in ogni caso non mai abbondante e ridotta alla più semplice morfologia di una *Mycotorula* degradata (confronta la fig. 2 della tav. 31 di Langeron e Guerra), con blastospore scarse in verticilli ridotti. La sola differenza sta nel fatto che il *Blastodendrion Flareri* non fermenta e, in condizioni abituali di studio ciò è riconosciuto anche da Langeron e Guerra. Questi Autori, lavorando su acqua di lievito e seminando enorme quantità del micete in coltura giovane, hanno ottenuto una debolissima fermentazione del glucosio. Nella chiave analitica gli stessi Autori indicano „potere fermentativo quasi nullo" e, per le specie del „gruppo *Brumpti*" in cui il *Blastodendrion Flareri* viene inserito, è indicata la fermentazione debole per il glucosio e per il levulosio.

Tenendo in considerazione che il *Blastodendrion Flareri* è stato isolato a Messina e che pure l'attuale ceppo proviene da Messina, è logico ravvicinarli tra di loro pur tenendo presente che l'attuale ceppo mostra delle fermentazioni manifeste sebbene tardive e scarse (sopratutto per il mannosio). Noi non conosciamo in quali rapporti debba precisamente stare la sistematica delle specie con le modificazioni dei caratteri fermentativi, ciò che ci autorizza per il monento a tenere distinto il ceppo del Dr. Pisacane, come una terza specie del gruppo „*Candida Brumpti*" e per noi una specie affine al *Blastodendrion Flareri*. Di specie a morfologia ignota che hanno la stessa modalità di fermentazione (escluso il *Cryptococcus Mirandei* e il *Cryptococcus Coppelli* ad habitat particolare e probabilmente non filamentosi; esclusa la *Monilia londinensis* e la *M. intestinalis* che sono da riportare a *Mycotorula albicans*) rimarrebbe solo la *Monilia Negri* Cast. et Chalm., 1916 i cui caratteri fermentativi sono stati modificati da Castellani e Chalmers stessi tra il 1916 ed il 1919 e modificati persino i caratteri colturali, sicchè è una specie oggi irriconoscibile.

Per conseguenza, non ci rimane altro che dare al nostro ceppo un nuovo nome, anche tenendo presente il caso speciale che, se i rapporti con il *Blastodendrion Flareri* sono giustificati, l'ascrivere il ceppo in studio come varietà del *B. Flareri* stesso porterebbe alla curiosa situazione di assegnare al tipo la forma colturalmente e biochimicamente più degradata ed alla varietà quella relativamente più evoluta.

Diagnosi:
Mycotorula messanensis Ciferri et Redaelli, 1942.
„colonia gigante in agar glucosato, rotonda, bianca, liscia e lucente in superficie, zona centrale piana con alone periferico degradante sino ai margini finemente dentellati. In sustrati liquidi scarso sviluppo al fondo. Blastospore globose, rotonde o lievemente ovalari, 3.5 Q di diam., ma anche 4—5 Q oppure 3.5 × 4.5 Q, isolate o disposte in catenelle e rosette ed in verticilli tipo *Mycotorula* su apparato filamentoso scarso, poco ramificato e con caratteri primordiali e degradati rispetto alle *Mycotorula* più evolute. Assenza di aschi. Fermenta tardivamente e scarsamente il glucosio ed il levulosio, molto scarsamente il mannosio; acidifica glucosio, mannosio, levulosio e saccarosio, scarsamente il mannosio ed il galattosio, non acidifica il lattosio ed il raffinosio. Assimila bene il glucosio ed il levulosio."
Habitat: isolato dal Dr. Pisacane da un caso di dermatosi sull'uomo (Messina, Italia).

Mycotorula zeylanoides (Castellani) Red. et Cif. (Arch. f. Mikrob., 6, 43, 1935).
— ceppo isolato da pasta di legno in Italia dal Prof. G. Goidanich (stipite N. 15). In merito vedi Goidanich G., Ciferri R. e Redaelli P., Mycopathologia, 2 (1), 48—51, 1939.

Mycotorula mucinosa Goid. Cif. et Red. (Mycopathologia, 2, 49, 1939).
— ceppo isolato come il precedente (stipite N. 17). vedasi la stessa letteratura.

Trichosporon beigeli (Rabenhorst) Vuill. (Arch. de parasitol., 5, 38—66, 1902).
— ceppo isolato da pasta di legno in Italia (Prof. Goidanich, N. 433); tale isolamento è interessante in quanto, a nostra conoscenza, è la prima volta che una specie ritenuta sin qui esclusivamente vivente sull'uomo si trova in un sustrato morto. Per altri dati intorno a questa specie vedasi Redaelli P. e Ciferri R., Mycopathologia, 3, (2), 207, 1941.

Trichosporon infestans (Moses et Vianna) Cif. et Red. (Arch. f. Mikrob., 6, 69, 1935).
— ceppo isolato da cute normale dell'uomo dal Prof. Falchi della Clinica Dermosifilopatica di Pavia (Italia) (stipiti N. 57a e 57b); per la letteratura vedasi quanto è stato detto a proposito del *Trichosporon Beigeli*.
— ceppo isolato dal succo gastrico lievemente iperacido in un caso di gastrite poliposa del fondo e della regione cardiale dal Prof. G. Callerio di Voghera (Italia) (stipite N. 95b); il micete era associato ad un lievito rosa (stipite N. 95a) e ad un lievito bianco (stipite N. 95c). Letteratura come per le due specie precedenti.

Trichosporon cutaneum (De Beurman et Gougerot) Ota (Ann. parasitol. hum. comp., 4, 2—13, 1927).
— ceppo isolato da Peña Chavarria in Costa Rica da una dermatite papulo-verrucoide della cute del capo e descritto da M. Moore come *Hemispora coremiformis*. Per una discussione in merito vedi Redaelli P. e Ciferri R., Mycopathologia, 3 (2), 205, 1941.

Trichosporon luchettii Cif. et Red. (Mycopathologia, 3, 209, 1941)l.
— ceppo isolato dal Prof. G. Luchetti da formaggio pecorino a Pisa (Italia); per la descrizione della specie vedi la letteratura citata a proposito delle altre specie di *Trichosporon* (stipiti N. 74 e 75).

Geotrichum candidum Link (Mag. Gesellsch. Naturfsch. Freunde, Berlin, 3, 17, 1809).
— ceppo isolato dall'espettorato di un paziente con forma di pseudotubercolosi, dal Dr. Re in Milano (Italia) (stipite N. 6).

— ceppo isolato da una lesione del piede dal Prof. Latteri in Messina (Italia) (stipite N. 13b) associato alla *Mycotorula Guilliermondi* (vedi stipite N. 13c) e ad un *Cephalosporium* (stipite N. 13b).

— ceppo isolato da cute normale dell'uomo dal Prof. G. Falchi della Clinica Dermosifilopatica di Pavia (Italia) (stipite N. 27).

— ceppo isolato da una faringite grave per sospetta difterite in soggetto adulto dalla infermiera della Croce Rossa Rachele Maga in Milano (Italia) (stipite N. 87a); il ceppo era associato alla *Mycotorula Chalmersi* (stipite N. 87b).

Geotrichum sp.

— ceppo isolato da un lievito di panificazione nel Laboratorio della Sanità del Ministero dell'Interno (Roma) (stipite B. 102).

— ceppo isolato da feci diarroiche di un soggetto proveniente dall'Africa Orientale Italiana dal Dr. F. Colonnello, Vice-direttore della Clinica delle Malattie tropicali del Comune di Milano (Italia) (stipite N. 108).

Cystidiella valdensis Malan (Mycopathologia, **3**, 1941).

— ceppo avuto come trapianto dello stipite originale di Malan; esso è stato inoculato per via endovenosa (5 cc. di sospensione in sol. fisiologica) in un coniglio; l'esito della inoculazione fu nulla; dello stesso materiale vennero inoculati 2 cc in testicolo e peritoneo di ratto; l'animale ha sopravissuto senza lesioni locali.

Aerobasidium pullulans (De Bary) Arnaud (Traité de pathol. veget., vol. 1, 193) (= *Pullularia pullulans* Berkhaut; = *Dematium pullulans* De Bary).

— ceppo isolato da una dermatite cronica erosiva superficiale della guancia con metastasi al dorso in una signora di Tripoli (stipite N. 9a), ed inviato dal Prof. Tommasi della R. Università di Palermo (Italia); insieme alla *Torulopsis candida* (stipite N. 9b) e ad un *Hormodendron* sp. (stipite N. 9c).

— ceppi isolati da cute normale dell'uomo dal Prof. G. Falchi della Clinica dermosifilopatica di Pavia (Italia) (N. 28b, 28b, 55a, 55b, 55c, 58a e 58b, nel 1938).

— ceppo isolato da foglie di ciclamino nella R. Stazione di Patologia vegetale di Roma, ed inviato col N. 6881 (stipite N. 84).

— ceppo isolato da cute di cani affetti da dermatofizia, dal Dr. L. Locatelli in Bergamo (Italia) (stapite N. 100).

— ceppo isolato da coagulo di sangue in vitro dal Dr. G. B. Cottini della Clin. dermosifilopatica di Catania (Italia) e contrassegnato come „ceppo Rubino" (stipite N. 125).

Cephalosporium sp. del gruppo **Allantospora.**

— ceppo isolato da una lesione del piede dal Prof. Latteri (Messina, Italia) (stipite N. 13b), associato alla *Mycotorula Guilliermondi* (stipite N. 13c) ed al *Geotrichum candidum* (stipite N. 13a).

Glenospora viridobrunnea Red. et Cif.

— ceppo isolato dal Dr. L. Giornelli (stipite N. 73) In data 27 maggio 1939, da un caso di micetoma sono stati coltivati i piccoli grani neri che si rinvennero nei nodi granulomatosi di una intumescenza dura, bernoccoluta, localizzata al dorso ed alla pianta del piede destro di una donna ricoverata nella clinica chirurgica della R. Università di Perugia,

Caratteri colturali: nei terreni solidi in genere e particolarmente nei sustrati zuccherati (agar glucosato), lo sviluppo inizia con una fine raggiera bianca intorno al frammento insemenzato; questa raggiera si estende perifericamente come un alone mentre il frammento, ingrandisce di poco, si sopraeleva sul sustrato, si piega variamente cosi da apparire, ad un certo momento, plicato quasi cerebroide. Per un periodo più o meno lungo, la vegetazione ifomicetica resta biancastra o lievemente giallastra, liscia o poco vellutata; quindi (dopo circa 20 giorni od anche un mese) essa si fa nettamente pulverulenta in superficie, estendendosi questo aspetto anche alla vegetazione centrale sopreleva ta. Il colore che la colonia assume è caratteristica passando dal giallastro (inizialmente) al verdastro tenue (successivamente) sino ad assumere nelle vecchie colture un colore tenuamente brunastro; la colonia, che mantiene un aspetto rotondeggiante di un diametro non superiore ad un centimetro, con la parte centrale della forma che si è detto, si stabilizza quindi con un carattere di superficie nettamente pulverulento, sia pure finemente. Il sustrato, con l'andare del tempo, si pigmenta in rosso-bruno intenso, la colorazione si estende dalla colonia per un largo raggio. Alcuni tubi sono stati chiusi alla fiamma dopo 15 giorni di sviluppo a temperatura ambiente (mese di lugio a Pavia), quando cioè era nello stadio primo, vale a dire poco estesa, con la parte centrale ancor poco sviluppata e l'alone ifomicetiforme lievemente pulverulento e grigio-biancastro; l'ulteriore carenza di ossigeno ha arrestato quasi improvvisamente lo sviluppo per cui non si è avuta la caratteristica colorazione del sustrato.

Caratteri micromorfologici: i caratteri micromorfologici sono piuttosto banali e primitivi; il micelio è per lo più rettilineo, settato, di spessore diverso nelle diverse ife, per quanto uniforme nella stessa ifa; la larghezza varia da 3—3.5 μ sino a 5 μ; i setti non sono mai molto lunghi; la struttura interna è semplice e regolare, ad eccezione di alcuni tratti terminali, preclamidosporici che mostrano un contenuto finemente granuloso; la parete è semplice sebbene nettamente evidente. Le ife sono ialine. Alcune estremità rigonfiano a clava a contenuto granuloso; altre presentano un aleuro-conidio terminale, altre una formazione che può ritenersi una vera clamidospora a doppio contorno, a contenuto granuloso irregolare. Le ife fertili appaiono generalmente poco più sottili delle ife sterili. Sulle ife fertili si formano degli aleuro-conidi più frequentemente laterali, più raramente terminali, portati da peduncoli di solito brevi (non superanti i 15—20 μ, generalmente molto brevi, pochi μ) talora addirittura sessili. Questi aleuroconidi sono globosi, di solito rotondi ma anche lievemente, sebbene raramente, ovalari o piriformi, di grandezza variabile da 3,5 μ sino a 7—10 μ, con membrana bene evidente e contenuto di gocciole o grani o finemente pulverulenti. Essi sono tenacemente attaccati e non si disgiungono neppur sotto forti pressioni. Nelle colture sofferenti si hanno ife pettinate, altre irregolarmente globose per la presenza di cellarioli o ipnospore intercalari.

In sezione nei preparati istologici, il micete si presenta ora in elementi isolati, ora in ammassi che costituiscono i „grani". Quando è in elementi isolati questi appaiono come tozze formazioni dall'aspetto di frammenti di ifa, a membrana spessa, apparentemente non settati, di colorito decisamente bruno o giallo-bruno, di solito incluse nel corpo di grosse cellule giganti multinucleate che stanno al centro di formazioni di tipo granulomatoso. Gli ammassi maggiori („grani") sono costituiti dal micete che si dispone con i suoi elementi piuttosto irregolarmente; se noi schematizziamo la struttura di questi grani possiamo distinguere una porzione periferica a guisa di alone piuttosto sottile costituita da una sostanza amorfa di colorito giallastro o bruniccio in cui stanno delle formazioni miceliari talora disposte a raggiera, dello stesso colore ma poco più intenso di quello della magma di fondo; questo alone non è regolare, ma disegna spesso delle ampie volute a festoni ed a mammellonature; all'indentro di esso stà una zona in cui si distinguono delle formazioni rotondeggianti, piuttosto grosse (7—10—12 μ ed anchedi più) che, pur nella incertezza della struttura e della intensa colorazione brunastra, paiono essere delle grosse clamidospore a membrana spessa; la parte centrale del grano è generalmente costituita da una magna amorfa, giallastra, solcata da elementi del fungo. Naturalmente questa struttura varia molto da grano a grano ed a seconda della sezione sotto la quale il grano è osservato.

Caratteri biochimici: il micete non presenta alcuna definita caratteristica biochimica.

Sulla base degli elementi macroscopici e microscopici („in vitro" e „in vivo") è

possibile giungere alla definizione generica del micete, che è stato compreso nel genere *Glenospora*. Questo genere è tuttora allo studio perchè le sue affinità con generi più definiti e meglio studiati sono ancora oggi da stabilirsi cosicchè molte delle specie in esso incluse potrebbero anche riportarsi a generi diversi. In fine non poche specie sono cosi insufficientemente descritte da doversi escludere o dichiarare dubbie.

Molto più difficile resta l'identificare il ceppo in studio con le specie sino ad ora note; esso non può identificarsi con la *G. Boydi* (Shear) Pollacci et Nannizzi, 1928, che è lo stato conidico della *Allescheria Boydi* (Shear); ad essa non corrispondono nè i caratteri macroscopici nè quelli microscopici. La *G. brevis* Castellani 1933, la *G. lanuginosa* (Castellani) Agostini 1931, la *G. Semoni* Chalmers et Archibald, 1937 sono specie troppo poco descritte perchè si possa fare con qualche risultato una precisa comparazione. La *G. meteuropea* Castellani 1933 è stata identificata da Redaelli, Ciferri e recentemente da Montessori (Mycopathologia, **3**, 1941) con il *Coccidioides immitis*. La *G. lanuginosa* è stata riportata dal Dodge a *Trichosporium Gammeli* var. *lanuginosum*, vale a dire a varietà della *Glenospora Gammeli* Pollacci et Nannizzi 1926 che è stata isolata da una micosi generalizzata in America del Nord e da una dermatomicosi a Roma (Tarantelli). La *Glenospora Graphii* (Harz et Bezold) Vuillemin 1912, deve probabilmente essere esclusa del genere, mentre la *Glenospora khartoumensis* Chalmers et Archibald 1916 è già stata riportata da Redaelli e Ciferri (1940) a *Madurella*; la stessa sorte probabilmente deve toccare anche alla *Glenospora Clapieri* 1927. La *Glenospora gandavensis* Vuillemin 1921 si differenzia nettamente dal nostro ceppo per le colonie cupoliformi nere.

Come si vede ben poco resta da fare per un'utile comparazione: riprendendo la questione da un altro punto di vista, da quello cioè dell'analisi del nostro ceppo in rapporto alle specie note come agenti di micetomi e particolarmente di micetomi del piede, vediamo che solo la *G. Clapieri*, la *G. Semoni*, e la *G. Boydi* possono essere prese in considerazione; per quello che si è detto sopra, appare chiaro che il nostro ceppo non corrisponde a nessuna di esse.

La identificazione del nostro ceppo con le specie surricordate resta pertanto difficile se non impossibile; la situazione è aggravata dal fatto che le specie note hanno tutte una micromorfologia molto banale, uniforme, senza precisi caratteri differenziali; anche i caratteri colturali sono di difficile differenziazione; molto spesso le colonie delle specie di *Glenospora* sono lente nello sviluppo (come la nostra); hanno vegetazioni finemente pulverulenti e colorazioni che vanno dal grigiastro sporco, al bruno sino al nero. La nostra specie forse si caratterizza per una sfumatura verdiccia con passaggi al bruno-ocraceo nelle colonie vecchie.

In attesa che una revisione eseguita su tutte le specie note e degne di entrare nel mal definito genere *Glenospora* e che possano le affinità di questo genere essere precisate, crediamo opportuno, dopo aver dato la descrizione dettagliata del fungo (che è ciò che più conta) indicare il ceppo come una specie nuova „ad interim". Essa viene da noi indicata come *Glenospora viridobrunnea* Redaelli e Ciferri *1941*

Glenospora viridobrunnea Redaelli et Ciferri, 1941.

„In coltura su terreni solidi, colonie lente nello sviluppo, rotonde con centro sopraelevato plicato quasi cerebroideo, alone periferico piano ifomicetiforme dapprima bianco liscio, poi grigiastro pulverulento, infine (nelle colonie vecchie) pulverulento in toto e di colore verdiccio brunastro; il sustrato si colora intensamente e totalmente di bruno. Micelio di diverso spessore da 3—3.5 μ sino a 5 μ; settato a corti segmenti con, parete bene evidente; micelio fertile diritto od anche a ife pettinate e con ipnospore intercalari (nelle colture sofferenti); eleuroconidi prevalentemente laterali raramente ter-

minali, portati da peduncoli di solito molto brevi, raramente poco lunghi, aleuroconidi globosi, rotondi, raramente ovalari e piriformi di grandezza variabile da 3.5 sino a 7—10 μ, con membrana bene evidente e contenuto granuloso o di goccìole di varia dimensione. Non frequenti le clamidospore apicali.

„In vivo" grani piccoli (delle dimensioni di una capocchia di spillo ed anche meno) di colore nero costituiti da elementi miceliali e da grosse clamidospore incluse in una magna amorfa colorata in giallastro od in bruno.

Non possiede evidenti attività biochimiche, non sembra essere patogena sperimentalmente per gli animali da laboratorio.

Habitat: isolata dal Dottor L. Giornelli da nodosità di una intemescenza del dorso e della pianta del piede (micetoma maduromicosico) in una donna di Perugia (1939).

Hormodendron sp.

— ceppo isolato da una dermatite cronica erosiva superficiale della guancia in una Signora di Tripoli; inviato dal Prof. Tommasi (Palermo, Italia) (stipite 9c); il ceppo era associato con l'*Aerobasidium pullulans* (stipite 9a) e con la *Torulopsis candida* (stipite 9b).

Fusarium sp.

— ceppo isolato da un caso di micosi congiuntivale di una donna di Capitignano Picentino (Napoli, Italia) e studiato dal Dr. T. Maestro della Clinica oculistica della R. Università di Napoli. Questo ceppo ci è pervenuto con il binomio *Geotrichoides rosacea* Maestro. Il fungo è molto evidentemente una specie del genere *Fusarium* non ulteriormente identificata. Per la descrizione del caso e le osservazioni colturali, morfologiche e biochimiche vedi T. Maestro, Ann. di Ottalmologia e Clin. Ocul., 66, (6), 439, 1938. (stipite N. 68).

Oospora nivea (Fuck.) Sacc. et Vogl. (Lindau, Hyphomycetes, p. 29).

— ceppo isolato da una lesione della parete addominale e dell'omento di un cane con peritonite fibrinosa purulenta, con reperto di elementi bacilliformi e miceliari nel materiale patologico; inviato dal Prof. Barbino dell'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria della R. Università di Perugia (Italia) (stipite N. 79).

Sporendonema epizoum (Corda) Cif. et Red. (Atti Istit. Botan. Univ. di Pavia, serie IV, 5, 145—198, 1934).

— ceppo isolato da pesce salato su cui produce forti danni ed inviato dal Dr. Mark Frank del Fischer Research Board of Canada, Halifax (Canada) (stipite N. 99).

Trichotecium roseum Link (Observ. Mycol. 1, 16, 1809).

— ceppo isolato da materiale di lesioni profonde di tricofizia infiammatoria in un soggetto di anni 17 dal Prof. M. Tamponi della Clinica Dermosifilopatica dell R. Univ. di Parma (stipite N. 113).

Penicillium digitatum (Pers.) Sacc. (Fungi ital. tab. 894, 1881).

— ceppo isolato da materiale tonsillare ed inviato dal Prof. S. Citelli della R. Univ. di Catania (Italia) (stipite N. 86).

Penicillium glaucum Link (Mag. Gesell. Naturf. Fr. Berlin, 3, 17, 1809).

— ceppo isolato da essudato uretrale di una paziente affetta da uretrite cronica non specifica, inviato dal Prof. Policaro (Merano, Italia) stipite N. 114).

Aspergillus glaucus Link (Spec. Plant. Fungi, **1**, 57).

— ceppo isolato da un nodo di tipo gommoso dell'avambraccio di una malata per la quale era stata emessa la diagnosi di sospetta sporotricosi; inviato dal Prof. MARIOTTI della Clinica Dermosifilopatica di Parma (Italia) (stipite N. 120).

Elenco dei contributi micologici e micopatologici pubblicati negli anni 1938-1941

1) Ciferri R., *Aspergillus stellatus*, forma conidica dell'*Emericella variecolor* o *Inzengaea asterosperma*. Mycopathologia, **1**, (4), 305 1939. — 2) Ciferri R. A proposito del riferimento di *Emericella variecolor* Berk. et Br. ad *Aspergillus* effettuato da Thom e Raper. Mycopathologia **3**, 1941. — 3) Ciferri R. e Redaelli P., Dedicatoria, Mycopathologia, **1** (1), 1, 1938. — 4) Ciferri R. and Redaelli P., A new hypothesis on the natura of *Blastocystis*. Mycopathologia, **1**, (1), 3, 1938. — 5) Ciferri R. and Redaelli P., *Mycotorula* vs. *Candida*. a plea. Mycopathologia, **2**, (2), 73, 1939 — 6) Ciferri R. e Redaelli P., Segnalazione dello *Sporendonema epizoum* (Corda) Cif. et Red. su frutti di dattero in Libia. Mycopathologia, **2**, (3), 162, 1940. — 7) Ciferri R. e Redaelli P., Sulle affinità e posizione sistematica dei generi *Madurella* e *Indiella*. Mycopathologia, **3**, (2), 182, 1941. — 8) Ciferri R. e Redaelli P., L'impostazione dello studio di alcuni funghi parassiti e e patogeni dell'uomo (a proposito di una pubblicazione su *Histoplasma*). Mycopathologia, **3**, 1941. — 9) Ciferri R. e Redaelli P., Posizione sistematica e affinità dell'*Aegerita Webberi*. Mycopathologia, **3**, 1941. — 10) Ciferri R. e Redaelli P., e Cavallero C., L'*Oidium* albicans Robin (*Mycotorula albicans*, (Robin) Lang. et Tal., 1932: studio critico e sperimentale). Mycopathologia, **1**, (2), 115, 1938. — 11) Ciferri R., Redaelli P. and Visocchi V., The Histoplasmaceae family. Mycopathologia, **1**, (2), 104, 1938. — 12) Ciferri R. and Verona O., A species of Sporobolomyces (Nectaromycetaceae) isolated from man and revision of the genus. Mycopathologia, **1**, (2), 162, 1938. — 13) Ciferri R., Verona P. e Saggese V., Reisolamento dello *Pseudomycoderma matalense* e revisione del gruppo. Mycopathologia, **1**, (3), 212, 1938. — 14) Redaelli P., Osservazioni e considerazioni au alcune aspetti anatomici e funzionali del Sistema reticolo-istiocitario nella malattia sperimentale da *Histoplasma capsulatum* Darling. Rivista di patol. sperim., **20**, (1—2), 1938. — 15) Redaelli P., Sul significato del commensalismo microbico. Athena, 1938. — 16) Redaelli P., Equilibri allergici nella genesi e nell'evoluzione delle malattie fungine dell'uomo. Atti Accad Med. Lombarda, **26**, (1), 1, 1939. — 17) Redaelli P., Saggio di sintesi comparativa fra la leishmaniosi viscerale e l'istoplasmosi di Darling. Arch. De Vecchi, **1**, (2), 165, 1939. — 18) Redaelli P., Le algosi. Cenni generali sulle alghe parassite del corpo umano e di animali con notizie sulle malattie da esse determinate. Rass. Clin. scientifica Istit. Lorenzini, Sao Paulo, **9**, (12), 443, 1940. — 19) Redaelli P., Malattie allergiche ad eziologia micosica. Athena, **10**, 131, 1941. — 20) Redaelli P., Das Immunitätsproblem bei den Mykosen des Menschen. Mycopathologia, **3**, 1941. — 21) Redaelli P. e Ciferri R., Ulteriori osservazioni su *Blastocystis* della rana e conferme della natura e posizione sistematica dell'alga. Mycopathologia, **2**, (4), 239, 1940. — 22) Redaelli P. e Ciferri R., Nuovi reperti di *Trichosporon* ed osservazioni intorno a questo genere. Mycopathologia, **3**, (2), 203, 1941. — 23) Redaelli P. y Ciferri P., Novas contribuçoes ao estudo morphocytologico, biologico y sistematico do agente de granuloma paracoccidioides ou doenza de Lutz-Splendore-De Almeida. Resena clin. sci. do Istit. Bioc. Italo-brasileiro. S. Paulo, **7**, 1938. — 24) Redaelli P., Ciferri R. and Baldacci E., Blastomycosis. Sporotrichosis and Coccidioidal granuloma on animals and plants. Mycopathologia, **2**, (4), 322, 1940. — 25) Redaelli P., Ciferri E. e Cavallero C., Un'ipotesi sull'eterosmosi dei lieviti in rapporto alla dissociazione. Mycopathologia, **2**, (1), 12, 1939. — 26) Redaelli P., Ciferri R. e Cavallero C., Sul presunto *Endomyces albicans* Wuill. Mycopathologia, **2**, (2), 116, 1939. — 27) Redaelli P. Castelli T. and Ciferri R., Presence of *Mycotorula albicans* and *Blastodendrion Krausi* in italian home-made bread yeast. Mycopathologia, **1**, (3), 182. — 28) Redaelli P. e Silbergleit W. H., Colite algine par *Oscillatoria enterica* n. sp ad interim, dans un singe (*Cynocephalus hamadriadis*). Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiologia, (12), 1938. — 29) Redaelli P. and Visocchi V., Agostino Bassi precursor of comparative mycopathology. Mycopathologia, **2**, (1), 37, 1939—30) Cavallero C., Fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi. Mycopathologia, **1**, (4), 227, 1939. — 31) Cavallero C., L'allergia e

l'immunità nelle micosi. I°: Concetti generali sull'allergia. Metodi diagnostici. Allergia e immunità nelle Actinomicosi. Mycopathologia, **2**, (4), 219, 1940. — 32) Cavallero C., L'allergia e l'immunità nelle micosi. II° Allergia e immunità nelle micosi da lieviti (Blastomicosi) Mycopathologia, **3**, (1), 1, 1941. — 33) Cavallero C., L'allergia e l'immunità nelle micosi. III°: Allergia e immunità nelle Dermatofizie. Mycopathologia, **3**, (2), 140, 1941. — 34) Cavallero C., Fenomeni di dissociazione in un'alga coprofita aclorica (*Prototheca portoricensis* var. *trispora* Ashf. Cif. et Dalm.). Giorn. Batter. Immunol., **22**, (2), 259, 1938. — 35) Cavallero C., L'allergia e l'immunità nelle micosi. IV°: Allergia e immunità nelle micosi da ifomiceti e da ficomiceti. Mycopathologia, **3**, 1941. — 36) Cavallero C., L'allergia e l'immunità nelle micosi. V°: Allergia nelle malattie a presunta eziologia micosica. Malattie allergiche da funghi. Considerazioni generali e conclusioni. Mycopathologia, **4**, 1946 — 37) Giordano A., Studio micologico del *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Giord. e significato della specie nella patologia animale. Mycopathologia, **1**, (4), 274, 1939. — 38) Goidanich G., Ciferri R. e Redaelli P., Identificazione di alcuni lieviti isolati da pasta di legno. Mycopathologia, **2**, (1), 48, 1939. — 39) Silbergleit W. H. e Redaelli P., Colite algina da *Oscillatoria enterica* n. sp. ad interim, in una scimmia (*Cynocephalus hamadriadis*). Mycopathologia, **2**, (2), 107, 1939. — 40) Verona O. and Ciferri R., *Mycotorula albicans* associated with a disease of carrot. Mycopathologia, **1**, (4), 273, 1939 — 41) Verona O. e Ciferri R., Una presunta azione eccitante sui Funghi della pseudosoluzione etilenglicolica 3—5-dibenzantracene. Mycopathologia., **3**, (1), 44, 1941. — 42) Vidari E.. Granulomatosi sperimentali da specie del genere *Monosporium*. Mycopathologia, **3**, 1941. — 43) Bordonaro F., Micosi sperimentale da specie del genere *Glenospora*. Riv. patol. sperim., **21**, (5—6), 289, 1938. — 44) Montessori P. P., La granulomatosi coccidioide in Europa. Mycopathologia, **3**, (2), 131, 1941.

Riassunto

Gli Autori rendono conto dell'attività del „Centro di Micologia umana e comparata" della R. Università di Pavia nel corso degli anni dal 1938 al 1941. Danno un elenco dei lavori svolti nel Centro, di quelli pubblicati e di quelli rimasti inediti; tra questi riferiscono ricerche sulle specie del genere *Pericystis* Betts, del genere *Histoplasma* Darling e *Cystidiella* Malan. Studiano le seguenti specie nuove: *Mycotorula messanensis* e *Glenospora viridobrunnea*; assegnano un nuovo nome alle seguenti specie: *Torulopsis sexta* (Will), *Mycotorula pseudotropicalis* (Castellani), *Mycotorula Krausi* (Ota), *Mycotorula Chalmersi* (Castellani); quindi danno notizia del reisolamento e dello studio di diverse specie di dermatofiti, di lieviti e dit ifomiceti.

Zusammenfassung

Die Verff. referieren über die Tätigkeit des „Zentrums von menschlicher und vergleichender Mykologie" der Universität Pavia in den Jahren vom 1938 bis zum 1941. Sie geben ein Verzeichnis der im Zentrum dargelegten Arbeiten der veröffentlichten und der nicht ausgegebenen: unter diesen berichten sie Untersuchungen über die Arte des Genus *Pericystis* Betts, des Genus *Histoplasma* Darling und von *Cystidiella* Malan. Sie prüfen die folgenden neuen Arte: *Mycotorula messanensis* und *Glenospora viridobrunnea*; und geben einen neuen Namen den folgenden Arten: *Torulopsis sexta* (Will), *Mycotorula pseudotropicalis* (Castellani), *Mycotorula Krausi* (Ota), *Mycotorula Chalmersi* (Castellani); endlich geben sie Nachricht der Reisolierung und des Studium von verschiedenen Arten von Dermatophyten, Hefen und Hyphomyceten.

Sumario

El reporte de la actividad del „Centro di Micologia umana e comparata" de la Universidad de Pavia, durante los cuatros años desde el 1938 hasta el 1941 incluye, entre otras cosas, la descripción de las nuevas especies *Mycotorula messanensis* y *Glenospora viridobrunnea*, y las nuevas conbinaciones *Torulopsis sexta* (Will), *Mycotorula*

pseudotropicalis (Castellani), *Mycotorula Krausi* (Ota) y *Mycotorula Chalmersi* Castellani); la noticia del reislamiento de especies de levaduras, Dermatofitos y Ifomicetos; datas acerca los generos *Pericystis* Betts, *Histoplasma* Darling y *Cystidiella* Malan. La lista de los publicaciones imprimidas o por imprimir está referida.

Summary

In this report of the activity of the „Centro di Micologia umana e comparata" of the R. University of Pavia, during the four years from 1938 to 1941, the new species *Mycotorula messanensis* nob. and *Glenospora viridobrunnea* nob. are described. New combinations are: *Torulopsis sexta* (Will), *Mycotorula pseudotropicalis* (Castellani), *Mycotorula Krausi* (Ota), and *Mycotorula Chalmersi* (Castellani). Researches on the genera *Pericystis* Betts, *Histoplasma* Darling and *Cystidiella* Malan are resumed. The list of yeast, Dermatophytae and Hyphales studied in the laboratories, and of the papers published or to be published, are appended.

NOTA: Questo articolo vede solo ora la luce nonostante fosse già composto nel 1941. Nel frattempo (1941-1947) il Centro di Micologia ha subito le vicende inerenti alla guerra. Nell' anno 1943 il Prof. P. Redaelli é stato trasferito dall' Università di Pavia alla Università di Milano e anche la Sezione Medica del Centro di Micologia umana e comparata si é trasferito in Milano presso l' Istituto di Anatomia Patologica dell' Università (Via F. Sforza 38), mentre la sezione micologica é rimasta presso l' Istituto e Orto Botanico di Pavia, diretto dal Prof. R. Ciferri. Nel settembre 1944 i Professori Redaelli e Ciferri, come perseguitati politici hanno dovuto abbandonare le rispettive Università e hanno partecipato alla resistenza e alla lotta per la liberazione. In questo periodo le due sezioni del Centro di Micologia umana e Comparata non hanno potuto funzionare e le raccolte micologiche sono andate perdute con altro materiale del Centro. Nel giugno del 1945 le due sezioni del Centro hanno ripreso la loro attività, a Milano (sezione medica) e a Pavia (sezione micologica).

NOTE: The present article is being published only now, although it has been composed since 1941. In the meantime (1941-1947) the Centre for Mycology suffered from the vicissitudes connexed with the war. In 1943 prof. P. REDAELLI has been moved from the University of Pavia to the University of Milan, and the same happened of the Medical Section of the Centre for the Human and Compared Mycology. Its new address is as follows: Anatomopathological Institute of the University; via F. Sforza 38, Milan. The mycological Section instead remained annexed to the Botanical Institute and Garden of Pavia, whose director is prof. R. CIFERRI. In september 1944 professors Redaelli and Ciferri, as political persecuted, were compelled to leave their Universities, anb they took part in the resistance and in the struggle for the liberation of Italy. In this period the two sections of the Centre for the Human and compared Mycology could not work, and their mycological collections were wasted, together with other material. In June 1945 both sections of the Centre retook their activity, in Milan (Medical section) and in Pavia (Mycological section).

Sulla presenza e numero degli Actinomiceti nel terreno agrario in rapporto alle diverse stagioni dell'anno [1])

di

O. Verona

(*Dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della R. Università di Firenze*)

(17.XI.1941.)

(Con 4 fig.)

Il numero degli Actinomiceti, come quello di altri microrganismi, subisce, nel terreno agrario, variazioni più o meno profonde in relazione alle condizioni relative alla natura e giacitura dei suoli, alla profondità, alla altitudine e latitudine e in relazione, infine, alle variazioni stagionali.

Circa l'influenza di quest'ultime, antiche osservazioni di Hiltner e Störmer mettevano in rilievo come il numero maggiore di Actinomiceti si riscontrasse in autunno, rispetto almeno agli altri gruppi di microrganismi e ciò in rapporto all'aumentata quantità di sostanza organica indecomposta presente nel terreno in questa stagione.

Il fatto, naturalmente, è subordinato alla circostanza che le condizioni di suolo si prestino allo sviluppo degli Actinomiceti avuto particolare riguardo al suo contenuto in sostanza organica ed umidità ed al suo esponente acidimetrico. Per quest'ultimo è noto come la reazione ottima di sviluppo oscilli tra pH 7 e 7.5 essendo il pH ottimale dei Batteri e dei Funghi rispettivamente di pH 6.5—7 e pH 4—5.

Ebbene, nel corso di ricerche nostre e di altri eseguite nell'Istituto di Microbiologia Agraria della R. Università di Pisa su terreni di diversa costituzione, origine e provenienza, abbiamo avuto modo di constatare come l'osservazione di Hiltner e Störmer possa valere anche per i terreni italiani.

Per esemplificare riportiamo i reperti di analisi microbiologiche eseguite da Luchetti e da Rossi e Immé sui terreni di Maremma. Luchetti esaminò quattro diversi tipi di terreno dei quali tre a colture erbacee ed uno a vigneto, alle profondità di 15 e di 30 cm circa, situati in Val di Cornia e già parzialmente studiati da Verona e Malenotti ottenendo risultati cui alla Tab. I. Trattavasi di terreni di medio impasto o sabbiosi, quasi privi di calcare, con un contenuto in sostanza organica pari al 4—8%, pressochè neutri o tendenti all'acidità.

Rossi e Immé studiarono terreni situati più a sud, precisamente nella parte bassa di Val di Pecora nei pressi di Follonica (Grosseto). Prelevarono campioni di terreno di macchia litoranea (camp. 1), di padule (camp. 3) o altrimenti coltivati a colture erbacee in rotazione regolare (camp. 2) o irregolare (camp. 4). Trattavasi in ogni caso di terreni

[1]) Diamo ben volontieri ospitalità a questo studio che, a prima vista, può sembrare non avere diretto rapporto con la micopatologia umana, in quanto viene sempre più facendosi strada la convinzione che il grande serbatoio di tutte le forme actinomicosiche, incluse quelle patogene per l'uomo, d'altronde ancora poco chiaramente discriminate da quelle saprofite o da quelle parassite per le sole piante, sia proprio il suolo. In tal modo questo studio potrà avere qualche interesse per l'epidemiologia di alcune forme actinomicosiche umane ed animali. R. C. e P. R.

TAB. I — Numero di microrganismi presenti in media in gr. 1 di terra a cm. 15 e a cm. 30 circa di profondità in suoli diversamente coltivati e durante diversi periodi stagionali (dai dati di VERONA, LUCHETTI e MALENOTTI)

Stagioni	Profondità	Schizomiceti		Actinomiceti		Eumiceti		Totale
		assoluto	%	assoluto	%	assoluto	%	
Primavera	15	992.500	97.97	9,250	0.91	11.250	1.12	1013.000
	30	341.500	93.57	6.000	1.64	17.500	4.79	365.000
Estate	15	357.500	87.46	21.250	5.20	30.000	7.34	408.750
	30	279.750	85.16	25.000	7.61	23.750	7.23	328.500
Autunno	15	98.250	71.32	29.800	21.41	10.000	7.27	137.750
	30	104.000	75.36	25.000	18.12	9.000	6.25	138.000
Inverno	15	125.000	80.00	12.500	8.00	6.250	12.00	143.750
	30	87.500	82.35	13.750	12.95	5.000	4.70	106.250

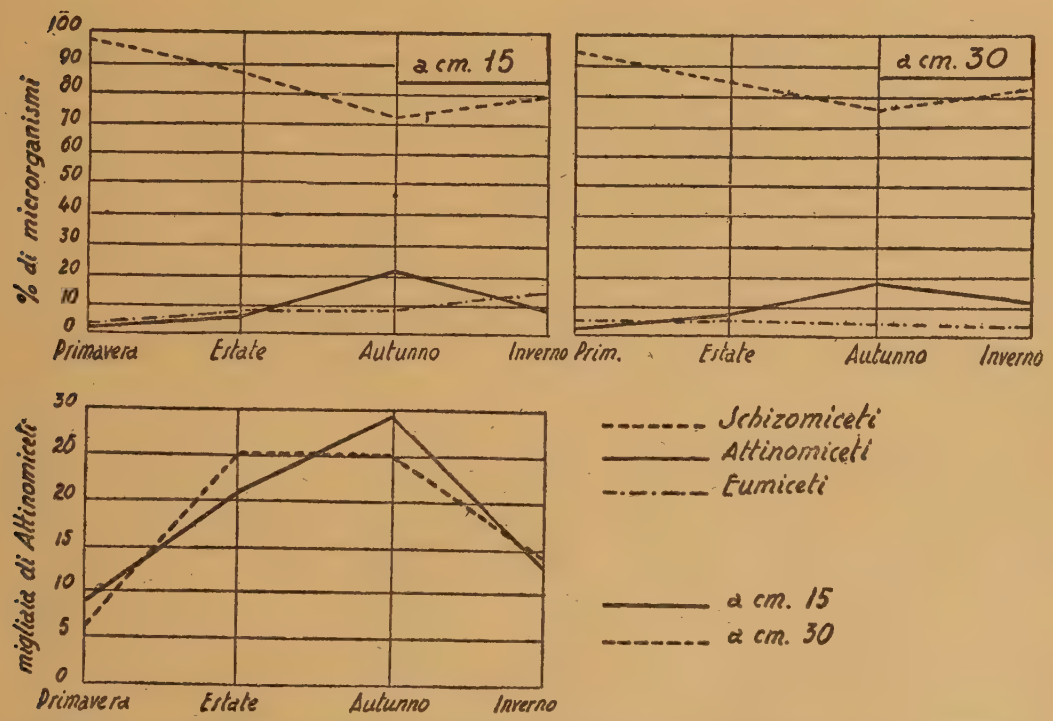


Fig. 1. Variazioni percentuali ed assolute nel Numero degli Actinomiceti durante le diverse stagioni nei terreni di Val Cornia (dai dati di VERONA, LUCHETTI e MALENOTTI).

di medio impasto salvo il terreno di padule tendenzialmente argilloso, più o meno provvisti di calcare e di sostanza organica e pressochè neutri.

I risultati conseguiti figurano nelle Tab. II e III.

TAB. II — Numero di microrganismi presenti in gr. 1 di terra a 15 cm. e a 30 cm. crica di profondità nei terreni di Val di Pecora (dai dati di ROSSI e IMMÉ).

Stagione	campione di profondità	Schizomiceti		Actinomiceti		Eumiceti		Totale
		assoluto	%	assoluto	%	assoluto	%	
Primavera	1 cm. 15	4.747.596	97.54	96.154	1.97	24.038	0.49	4.867.788
	1 cm. 30	4.312.354	98.68	46.620	1.06	11.655	0.26	4.370.629
	2 cm. 15	1.321.721	88.97	133.258	8.97	30.745	2.06	1.485.724
	2 cm. 30	5.350.516	99.05	41.340	0.76	10.309	0.19	5.402.165
	3 cm. 15	6.718.750	99.34	22.322	0.33	22.322	0.33	6.763.394
	3 cm. 30	2.541.030	98.30	33.154	1.20	10.985	0,42	2.585.169
	4 cm. 15	7.227.722	98.21	99.008	1.34	33.003	0.45	7.359.733
	4 cm. 30	1.582.418	94.77	65.428	3.92	21.978	1.31	1.669.824
Estate	1 cm. 15	737.705	76.60	10.246	1.06	215.164	22.34	963.115
	1 cm. 30	956.341	94.35	5.123	0.51	51.975	5.14	1.008.316
	2 cm. 15	1.166.329	94.21	—	—	71.704	5.79	1.238.033
	2 cm. 30	1.046.750	98.80	—	—	132.114	11.20	1.178.864
	3 cm. 15	761.317	77.90	—	—	216.049	22.10	977.366
	3 cm. 30	455.485	64.10	—	—	238.095	35.90	663.580
	4 cm. 15	915.639	90.82	10.289	1.02	82.305	8.16	1.008.233
	4 cm. 30	728.973	94.67	—	—	41.068	5.33	770.041
Autunno	1 cm. 15	3.196.490	91.90	219.366	6.30	26.676	1.80	3.478.532
	1 cm. 30	3.904.724	86.21	585.708	12.93	39.047	0.86	4.529.479
	2 cm. 15	1.160.493	94.02	49.382	3.99	24.691	1.99	1.234.566
	2 cm. 30	1.792.425	89.56	138.840	6.93	70.291	3.51	2.001.556
	3 cm. 15	1.556.672	91.44	113.507	6.66	32.430	1.90	1.702.609
	3 cm. 30	1.559.300	93.40	94.503	5.66	15.750	0.94	1.669.553
	4 cm. 15	641.925	94.12	20.060	2.94	20.060	2.94	682.045
	4 cm. 30	976.315	96.44	18.079	1.78	18.079	1.78	1.012.473
Inverno	1 cm. 15	1.912.006	91.18	143.914	6.86	41.118	1.96	2.097.038
	1 cm. 30	1.177.889	95.85	34.147	2.76	17.073	1.39	1.229.109
	2 cm. 15	2.486.452	95.10	95.616	3.57	35.616	1.33	2.677.684
	2 cm. 30	1.910.730	93.99	91.715	4.51	30.571	1.50	2.033.016
	3 cm. 15	3.081.661	96.61	184.930	5.55	61.633	1.86	3.328.224
	3 cm. 30	2.575.543	93.70	97.239	3.53	76.306	2.77	2.749.142
	4 cm. 15	2.362.385	88.08	252.293	9.40	68.807	2.52	2.683.485
	4 cm. 30	3.139.587	90.82	211.783	6.12	105.999	3.06	3.455.369

Considerati singolarmente i diversi campioni di terra della Tab. II e fig. 2, si rileva come il numero percentuale minimo di Actinomiceti di riscontri in estate, ed il numero massimo cada invece in corrispondenza del periodo autunnale o invernale per la maggior parte almeno dei campioni di terra esaminati.

Considerati poi i diversi campioni di terra nel loro complesso (Tab. III e fig. 3) si osserva che il numero massimo percentuale di Actinomiceti coincide, in superficie,

Tab. III — Numero di microrganismi presenti in media in 1 gr. di terreno a cm. 15 e a cm. 30 circa di profondità in suoli diversamente coltivati e durante i diversi periodi stagionali (dati di Rossi e Immé).

Stagioni	Profondità	Schizomiceti		Actinomiceti		Eumiceti		Totale
		assoluto	%	assoluto	%	assoluto	%	
Primavera	15	5.003.947	97.75	87.685	1.71	27.527	0.54	5.119.159
	30	3.446.579	98.28	46.637	1.33	13.732	0.39	3.506.948
Estate	15	895.247	85.54	5.143	0.48	146.305	13.98	1.046.686
	30	796.887	87.19	1.281	0.14	115.814	12.67	913.982
Autunno	15	1.638.895	92.36	100.579	5.67	34.964	1.97	1.774.438
	30	2.058.191	89.30	209.282	9.07	37.717	1.63	2.305.190
Inverno	15	2.460.626	91.76	169.188	6.31	51.793	1.93	2.681.607
	30	2.200.937	92.98	108.734	4.59	57.487	2.43	2.367.158

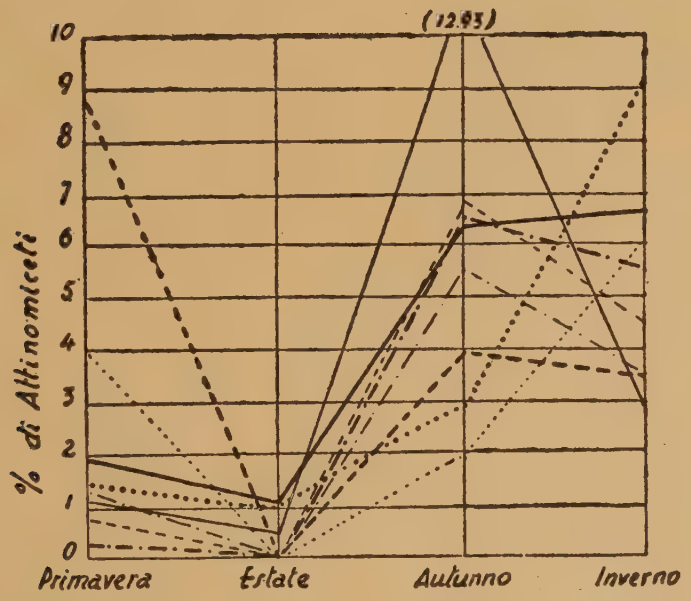


Fig. 2. Numero percentuale di Actinomiceti in terreni diversamente coltivati in Val di Pecora.

a cm. 15 ——————
a cm. 30 ——————
a cm. 15 — — — —
a cm. 30 - - - - - - -
a cm. 15 —.—.—.—.
a cm. 30 -.-.-.-.-.-.-.
a cm. 15 . . . . . .
a cm. 30 . . . . . .

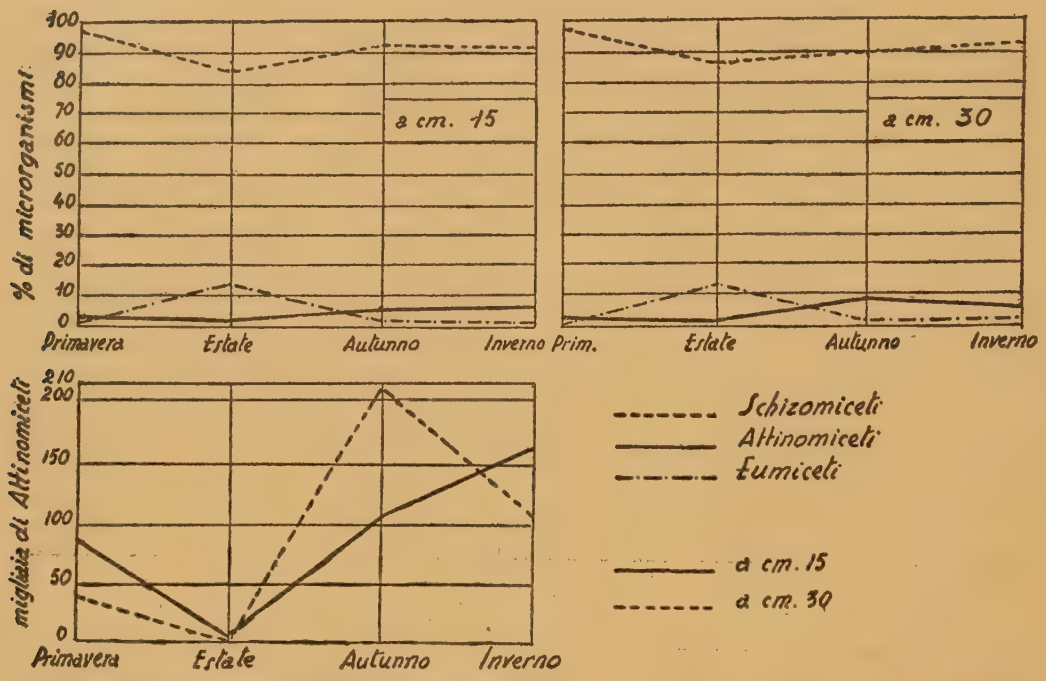


Fig. 3. Varazioni percentuali ed assolute nel Numero degli Actinomiceti durante le diverse stagioni nei terreni della Val di Pecora (dai dati di Rossi e Immé).

con il periodo autunno-invernale e, in profondità, decisamente con il periodo autunnale. Anche recentemente, esaminando, sotto questo punto di vista e per un certo periodo di tempo, i suoli forestali di Vallombrosa, abbiamo avuto modo di fare analoghe constatazioni.

Si osservino, al riguardo, i grafici della Fig. 4. Non mancano, naturalmente, ecce-

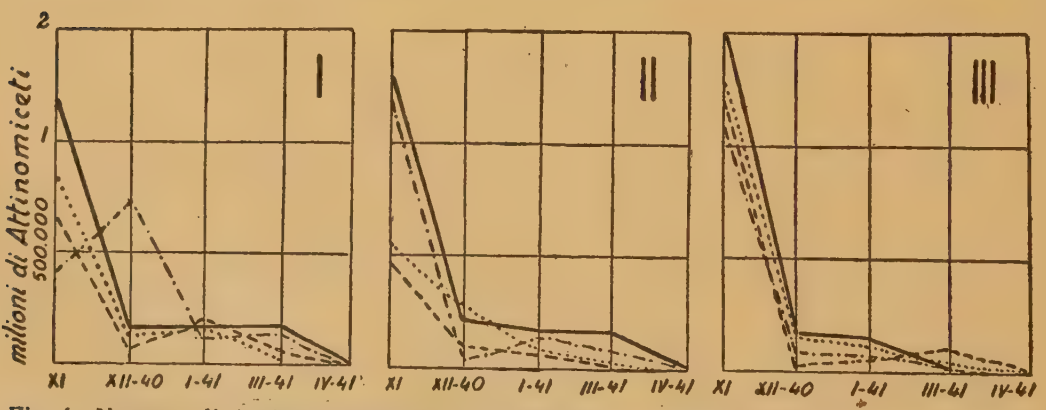


Fig. 4. Numero di Actinomiceti per gr. di terra secca nei suoli di Valombrosa alla profondità di cm. 5 (I), cm. 20 (II) e di cm. 50 (III).

Pseudotsuga
Castagno
Abete
Faggio

zioni e noi stessi abbiamo qualche volta constatato come, in alcune regioni, il numero massimo degli Actinomiceti si riscontri, piuttosto che in autunno, in corrispondenza di altre stagioni.

Ciò, comunque, non toglie valore all'osservazione di HILTNER e STÖRMER che rimane in massima confermata, dunque, per i terreni italiani.

Riassunto

Con riferimento ad una osservazione di HILTNER e STÖRMER si conferma che, anche nei terreni italiani il numero degli Actinomiceti tende ad essere massimo durante il periodo autunnale.

Zusammenfassung

Mit Berücksichtigung auf eine HILTNER und STÖRMER's Beobachtung betätigt Verf., dass auch bei den italienischen Boden die Zahl der Aktinomyceten höchst in der Erbstperiode zu sein pflegt.

Sumario

Con riferimiento a una observación de HILTNER y STÖRMER, el Autor conferma que, también en los suelos italianos, el numero de los Actinomicetos inclinase a ser el máximo durante el periodo de otoño.

Summary

With reference to one observation of HILTNER and STÖRMER, according the author also in italian soils, the numer of Actinomycetes (ray-fungi) approach to be the greatest during the autumnal period.

Resumé

Selon une observation de HILTNER et STÖRMER, confirmé par l'Auteur aussi pour les sols italiens, le numéro des Actinomycètes tend être au maximum pendant la saison d'automne.

Bibliografia

Hiltner L. und Störmer K., Arb. Biol. Abt. Land. r. Forstw., K. Gesundheitsamt, **3**, 445, (1903). — Luchetti G., Boll. R. Istit. Sup. Agr. di Pisa, **10**, (1934). — Rossi F., Immé G. B., Boll. R. Istit. Sup. Agr. di Pisa, **12**, (1936). — Verona O. e Malenotti G., Boll. R. Istit. Sup. Agr. di Pisa, **8**, (1932).

Reisolamento del *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm., e proposta del cambiamento del nome generico di *Mycoderma* Leberle in *Mycokluyveria* nobis

di

R. Ciferri e P. Redaelli

(*Dall'Istituto d'Anatomia Patologica, R. Univ. di Pavia e dall'Istituto di Botanica, Facoltà di Agraria, R. Univ. di Firenze*)

(1.XI.1941.)

Ceppo: N. 124 Castelli.

Substrato d'isolamento: isolato dai comuni lieviti di panificazione casalinga in Offida (Ascoli Piceno), Italia.

Caratteri colturali: in terreni solidi (agar glucosato Difco), la colonia si sviluppa lentamente formando una coltura bianco grigiastra, a superficie molto finemente trabecolata a rete, con margini irregolari per piccoli mammelloni poco prominenti sul substrato, senza strie radiali e senza vegetazione marginale filamentosa. Nel complesso la colonia è piuttosto banale e tale si mantiene anche in gelatina di mosto d'uva ove la reticolatura superficiale è più accentuata, ed il colore, dapprima bianchissimo, volge quindi dal bianco-grigiastro al cremeo o giallo-grigiastro; la colonia rimane molto superficiale e non troppo tenacemente intessuta.

In mezzi liquidi (acqua pepto-glucosata) si forma un anello sottile ma piuttosto alto sulle pareti della provetta e quindi gradatamente un velo superficiale per saldatura di frammenti dello stesso che chiude completamente la superficie libera del liquido. Tale fragile velo cade facilmente al fondo della provetta ed in superficie torna a costituirsi. Il mezzo rimane limpido ed al fondo si ha un abbondante deposito fioccoso.

Caratteri biochimici: non fermenta nessuno dei carboidrati saggiati (glucosio, levulosio, galattosio, maltosio, mannosio, saccarosio, lattosio, raffinosio) ma forma acidità nei primi quattro, scarsamente in mannosio e galattosio; non fluidifica la gelatina. Assimila bene i glucidi saggiati (scarsamente il mannosio, pochissimo il lattosio ed il raffinosio). Assimila bene il peptone, poco le altre fonti di azoto e nulla i nitrati. Vive bene in liquidi nutritizi addizionati di alcool etilico che distrugge molto lentamente, formandosi un velo sottile e frammentario.

Caratteri micromorfologici: in terreni solidi e nel velo formato in terreni liquidi si ha la tipica morfologia descritta per i *Mycoderma* dei liquidi zuccherini ed alcoolici, a cominciare dagli agenti della „fioretta" del vino e della birra. Si ha cioè una rudimentale morfologia che, negli stadi iniziali, è quella di un *Blastodendrion* per formazione di brevi complessi gemmanti arbuscolari, i cui singoli rami si allungano ramificandosi ulteriormente e intrecciandosi ma sovrapponendosi solo scarsamente, cosicchè la vegetazione rimane superficiale e lo spessore della colonia è debolissimo. Non si ha micelio e neppure pseudomicelio, ma solo la formazione di lunghe catene, non troppo stabilmente aggregate, di elementi gemmanti di forma varia, generalmente ovalari più o meno allungate sino ad allittico-allungate od a forma di corto bastoncino. Le vegetazioni dei veli formati sulla superficie dei liquidi è simile, ma a tessitura ancora più lassa ed a catene più fragili.

La specie isolata dal lievito di panificazione che, nelle Marche (Italia), è conservato perpetuamente nella pasta di farina che si lascia superfermentare, si avvicina al *Mycoderma tannica* Asai (1918) isolato in Giappone da soluzioni contenenti tannini, da cui differisce per l'assenza di pseudomicelio, anche rudimentale, la colonia finemente reticolata (già indicata da Asai ma non ritrovata da Lodder) e, subordinatamente, per l'assimilazione del maltosio. Più ancora si accosta al *Mycoderma decolorans* Will della birra,

da cui differisce sopratutto per le cellule che non sono mai ricurvate. Pur non essendo, in linea di principio, d'accordo nel tentativo di reidentificare le vecchie specie con quelle attuali quando manchi almeno un elemento di sicurezza, e poichè si ammettono oggi i *Mycoderma vini* e *Mycoderma cerevisiae* di Desmazières, ci pare opportuno, nel caso attuale il reidentificare, sopratutto sulla base del substrato d'isolamento, la specie in studio con il *Mycoderma glutinis-farinulae* Desmazières (1826 e 1827).

* * *

Per le sue caratteristiche colturali, micromorfologiche e biochimiche il fungo in studio deve essere riferito al genere *Mycoderma* Leberle non Persoon nec Auct. pl., quale è stato recentemente accettato e definito dalla Lodder (1934). Tale genere fu creato da Persoon (1818) con *M. ollare* e *M. mesentericum*, *M. pergameneum* e *M. lagenae*, quattro specie egualmente non oggi reidentificabili dopochè il genere, sino a questi ultimi anni, ha subito molti e vari significati; la storia del genere è stata da noi stessi (1929) tracciata altrove e la riassumiamo brevemente rimandando al lavoro citato per i dettagli. Già nel 1823 Desmazières aveva rifuso *M. mesentericum* e *M. lagenae* nel *Mycoderma vini* e descritto il *Mycoderma cerevisiae*, e quindi (1825, 1826 e 1827) vi aggiungeva *M. malti-juniperini*, *M. malti-cerevisiae*, *M. glutinis-farinulae*, includendovi anche il *M. vini* di Vallot (1822). L'interpretazione del genere *Mycoderma* da parte di Desmazières (1826) è dubbia. Le due specie *M. malti-juniperini* e *M. lactis-butyrri* sono molto malamente e difficilmente interpretabili; per la pellicola bianca e rugosa e per la formazione di „articoli" (artrospore) a forma di parallelogramma con gli apici retti e gli angoli arrotondati, devono forse riferirsi a specie del genere Geotrichum o ad un genere a questo affine; tale pure sarebbe l'opinione di Vuillemin e del suo allievo, monografo del genere, Jannin (1913) che reidentifica le specie con il *Geotrichum lactis* (sub *Oidium lactis*). In tal modo erano già divergenti le viste di Desmazières da quelle di Persoon (1822) creatore del genere, le cui specie (*M. ollare*, *M. mesentericum*, ecc.) dei veli di vino e birra erano probabilmente mescolanze di più microrganismi; l'errore fu, del resto, ripetuto poi da Thompson (1852), Pasteur (1886), Hansen (1879), ecc. per i *Mycoderma aceti*, *M. Pasteurianus*, ecc. Da qui derivò l'impiego del nome generico *Mycoderma* da parte del Comitato dei Batteriologi americani (1917) per i microrganismi successivamente posti nel genere *Acetobacter*, avendosi abbandonato il nome generico *Mycoderma* per la sua ambiguità (1920). La confusione tra i miceti formanti veli bianchi alla superficie dei liquidi alcoolico-zuccherini (caratteristica che per molti anni, ed oggi ancora, viene riconosciuta come quelle principale per l'individuazione dei *Mycoderma*) fu sancita da *Saccardo* con il binomio *Geotrichum Mycoderma* (Bon.) Sacc. e, più ancora esplicitamente, nella diagnosi di Will (1910) perpetuandosi sino ad oggi come nelle recenti trattazioni di Guilliermond-Tanner (193.), di Castellani e Chalmers (1919), di Brumpt (1936), ecc.

La confusione tra *Geotrichum* artrosporeo e *Mycoderma* blastosporeo era stata tuttavia abbastanza bene discriminata da Leberle (1909) nel senso di escludere le forme artrosporee formanti veli dal genere *Mycoderma* ed in questo senso il genere è stato accettato dalla Lodder (1934), che ha riconosciuto sei specie. Ma l'equivoco sul significato del genere permane e ciò è dimostrato dal recente trattato del Dodge (1935) in cui *Mycoderma* è considerato come un genere a specie non fermentanti, non liquefacenti la gelatina ed aventi la morfologia dei *Geotrichum*; tale interpretazione è quindi diversa da quella tradizionale, ma sopratutto diversa dall'interpretazione di *Mycoderma* data da Leberle ed accettata dalla Lodder.

Nelle nostre note sui lieviti asporigeni abbiamo sempre evitato sia di negare che di accettare *Mycoderma*, non essendocene chiaro il significato, anche per non avere mai avuto occasione di studiare un *Mycoderma* nel senso di LEBERLE; ma dopo l'accettazione di questo genere e la sua revisione da parte della LODDER e le nostre personali osservazioni su vari ceppi isolati da vari substrati e principalmente da vino e birra, ci siamo persuasi dell'opportunità di ammissione del genere in questione.

Ben poco abbiamo da aggiungere alle caratteristiche indicate dalla studiosa olandese LODDER a cui rimandiamo per i dettagli. I veli formati sulla superficie dei terreni liquidi e le colonie giganti in agar sono poco caratteristiche ed abbastanza facili ad esser confuse con quelle di *Geotrichum*; qualche differenza si manifesta nelle colonie su gelatina, ma in maniera difficile ad essere espressa. Al contrario, la micromorfologia è molto caratteristica, nei confronti almeno di *Geotrichum*, per la completa assenza di artrospore; qualche confusione potrebbe essere possibile, invece, con forme di *Blastosporion* a vegetazione non troppo depauperata, in quanto *Blastosporion* rappresenta appunto un genere a vegetazione di *Mycotorula* e di *Mycoderma* ridotta o, se si vuole, *Mycoderma* (e *Mycotorula*) rappresentano generi a vegetazione del tipo *Blastosporion* assai più ricca. Ma *Blastosporion* ha in più, per lo meno in molte specie, la formazione delle caratteristiche stalagmospore apicali che mancano in *Mycoderma*; dobbiamo notare infine che il genere *Blastosporion*, secondo le odierne vedute sistematiche, ha una scarsa ragione di esser accettato.

Qualche confusione potrebbe essere pure possibile con *Trichosporon* subgen. *Geotrichoides*, non già nelle colonie giganti bene sviluppate e nei vecchi veli bene distinti, ma nei primi stadi di sviluppo e quindi nelle vegetazioni iniziali che possono essere più ricche di blastospore anzichè di artrospore; in questi casi il criterio di differenziazione è la presenza di un vero micelio in *Geotrichoides* che manca del tutto in *Mycoderma*.

Se quindi il genere di LEBERLE quale è riconosciuto dalla LODDER può essere accettato, non ci pare possibile accettare e conservare il nome generico *Mycoderma* che, per le ragioni riassunte in precedenza, ha numerosi requisiti per essere respinto quale „nomen confusum". E' per tali ragioni che proponiamo la sostituzione di *Mycoderma* Persoon (non Auct. al.) emend. Leberle con il nome generico *Mycokluyveria* dedicandolo al Prof. K. J. KLUYVER al quale si deve la direzione dell'opera di revisione dei lieviti compiuta dal Laboratorio di Microbiologia di Delft.

Per quanto appare dalla descrizione delle specie interessanti la patologia medica umana ed animale, nessuna delle specie battezzate come *Mycoderma* è veramente riferibile a *Mycoderma* Leberle; nella nostra ormai lunga esperienza in proposito non ci è mai stato dato osservar specie patogene per l'uomo e gli animali, nè ci consta che altri ne abbiano osservate senza renderle note. Delle 12 specie mediche incluse da DODGE (1935) in tale genere (che questo micologo tipifica nel *M. mesentericum* Desm., una specie certamente mista), la maggior parte sono riferibili a *Geotrichum* od a *Trichosporon Geotrichoides*, una a *Trichosporon Proteomyces* e la altre sono assolutamente non reidentificabili [1]).

---

[1]) Le specie di MATTLET (1926) producono tutte delle artrospore come il *M. subtile* (Blanch) Verdun. Il *M. pseudo-albicans* (Neveu-Lemaire) Dodge ed il *M. pararugosum* (Cast. et Douglas) Dodge sono forse un *Trichosporon-Geotrichoides* il primo e, come è noto, un *Trichosporon-Proteomyces* il secondo; il *M. nobile* Sart. et al. si accosterebbe a *Geotrichum pseudomycoderma* ed il *M. multifermentans* (Cast.) Dodge è stato dimostrato esser riferibile ad altra specie: altre specie riportate da DODGE come *Mycoderma* non sono decifrabili.

Se ne deve concludere che, allo stato attuale delle nostre conoscenze, le *Mycokluyveria* non possono essere incluse tra i tipici miceti parassiti dell'uomo e degli animali superiori e che il loro habitat pare essere costituito di preferenza dai liquidi alcoolico-zuccherini, dai liquidi acido-zuccherini o da substrati ricchi di carboidrati solubili o non.

Chiave analitica dell specie di Mycokluyveria (= Mycoderma)meglio note [1].

A) colture liscie in substrati solidi . . . . . B)
AA) colture rugose o grinzose in substrati solidi . . . . . E)
B) non forma velo in soluzioni nutritizie alcoolizzate. *M. vini* (Desm.) nobis [2]
BB) forma velo in soluzioni nutritizie alcoolizzate. . . . . C)
C) azione intensamente acidificante sui vini; cellule di regola piccola (3—7 × 2—3 μ) . . . . . *M. acidificans* (De Rossi) nobis
CC) azione scarsamente acidificante o diminuente l'acidità dei vini; cellule di solito più lunghe . . . . . D)
D) cellule piuttosto allungate (2—5.5 × 7—10 μ); habitat preferenziale la birra. *M. cerevisiae* (Desm.) nobis [2]
DD) cellule ovate sino a globose; habitat preferenziale il vino di cui non modifica l'acidità totale . . . . . *M. duplex* (De Rossi) nobis
DDD) cellule generalmente di dimensioni intermedie tra quelle precedenti; habitat preferenziale il vino di cui diminuisce l'acidità totale. *M. tenax* (De Rossi) nobis
E) colture piane in mezzo solido, mai soprelevate nella parte centrale; habitat preferenziale i substrati tannici . . . . . *M. tannica* (Asai) nobis
EE) colture in mezzi solidi soprelevate nella parte centrale; habitat preferenziale birra o pasta di pane . . . . . F)
F) cellule in colture giovani su mezzi solidi piuttosto corte (non oltre 8 μ di lunghezza) . . . . . *M. Lafari* (Janke) nobis
FF) cellule in colture giovani su mezzi solidi piuttosto allungate (generalmente oltre gli 8 μ di lunghezza) . . . . . G)
G) forma pellicole in mezzi liquidi alcoolizzati. . . . . H)
GG) non forma una pellicola in mezzi liquidi alcoolizzati *M. valida* (Leberle) nobis
H) cellule generalmente ricurvate; habitat preferenziale la birra. *M. decolorans* (Will) nobis
HH) cellule non ricurvate; habitat preferenziale il lievito e la pasta di panificazione. *M. glutinis-farinulae* (Desm.) nobis

[1] Numerose altre specie si trovano descritte od indicate nella letteratura microbiologica, ma non ne teniamo conto data l'impossibilità di reidentificarle con esattezza mancando spesso dei caratteri diagnostici differenziali e persino di quelli essenziali, inclusi i caratteri di genere.

[2] Sarebbe forse preferibile abbandonare i binomi di *Mycoderma vini* Desm. e di *M. cerevisiae* Desm. in quanto non è possibile reidentificare le specie del Desmazières con qualcuna di quelle attuali, sia perchè la pluralità dei *Mycoderma* del vino è stata dimostrata da De Rossi (1917), sia perchè una delle caratteristiche di questa stessa specie, quale è riportata anche dalla Lodder, contraddice la diagnosi iniziale del Desmazières: la formazione di un velo in mezzo alcoolico, notata dal micologo francese, quindi osservata od ammessa da quasi tutti i trattatisti, è negata dalla Lodder.

Nomenclatura e sinonimia delle specie di Mycokluyveria considerate

MYCOKLUYVERIA VINI (Desm.) nobis, n. comb.
= *Mycoderma vini* Desmazières, 1827.
= *Saccharomyces mycoderma* Rees, 1870, p.p.

MYCOKLUYVERIA CEREVISIAE (Desm.) nobis, N. comb.
= *Mycoderma cerevisiae* Desmazières, 1827.
= *Saccharomyces mycoderma* Rees, 1870, p.p.
= *Mycoderma gallica* Leberle, 1910.

MYCOKLUYVERIA VALIDA (Leb.) nobis, n. comb.
= *Mycoderma valida* Leberle, 1910.

MYCOKLUYVERIA DECOLORANS (Will) nobis, n. comb.
= *Mycoderma decolorans* Will, 1899.

MYCOKLUYVERIA TANNICA (Asai) nobis, n. comb.
= *Mycoderma tannica* Asai, 1918.

MYCOKLUYVERIA LAFARI (Janke) nobis, n. comb.
= *Mycoderma Lafari* Janke, 1930.

MYCOKLUYVERIA GLUTINIS-FARINULAE (Desm.) nobis, n. comb.
= *Mycoderma glutinis-farinulae* Desmazières, 1827.

Riassunto

Gli Autori identificano nel *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm. uno stipite isolato dai comuni lieviti di panificazione casalinga nelle Marche (Italia). Da qui prendono lo spunto per rivedere la questione ancor oggi sospesa e discussa della validità del genere *Mycoderma*. Accettando l'emendamento che LEBERLE ha fatto sul primitivo significato dato al genere da PERSOON, ed accettando le revisioni recenti (1934) della LODDER, fissano le caratteristiche del genere e, constatando che il nome di *Mycoderma* deve considerarsi come „nomen confusum", propongono per lo stesso genere (inteso nel senso di LEBERLE) il nome *Mycokluyveria*. Riportano la sinonimia delle specie accettate ed una chiave analitica delle stesse.

Zusammenfassung

Die Verf. identifizieren als *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm. ein aus den gewöhnlichen Hefen der Hausbrotbereitung isolierter Stamm bei den Marken (Italien). Hieraus bekommen Verff. einen Stich um die noch heute eingestellte und besprochene Frage der Gültigkeit zu revidieren des Genus *Mycoderma*. Verff. nehmen die von LEBERLE vorgeschlagene Abänderung über die primäre Bedeutung an, welche PERSOON dem Genus gegeben hat und nehmen auch die neue Revisionen von Frl. LODDER an, indem sie die Kennzeichen des Genus festlegen. Endlich nehmen Verff. wahr, dass der Name *Mycoderma* als ein „nomen confusum" zu betrachten ist, und schlägen für denselben Genus (in Sinne von LEBERLE) den Namen *Mycokluyveria* vor. Sie führen die Synonimie der angenommenen Arte und einen analytischen Schlüssel derselben an.

Sumario

De una levadura domestica del pan de Italia fué aislada una cepa considerada igual al *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm. Con la ocaión se ha estudiado el valor y la nomenclatura del género *Mycoderma*, concluyendo con su aceptación con el emendamiento de LEBERLE, en el sentido de LODDER; pero el nome generico de *Mycoderma* Pers. siendo considerado como „nomen confusum", ha sido rechazado, proponiendo, en su vez, el de *Mycokluyveria*. Se incuye un elenco de las especies más conocides, con sus sinónimos y una llave analitica.

Summary

One strain of yeast for domestic bread-making, isolated in Italy, has been tentatively reidentified as *Mycoderma glutinis-farinulae* Desm. The validity and nomenclature of the genus *Mycoderma* is discussed. Accepting this genus on the base of Leberle modification of Persoon's signification, also following the studies made by Lodder, the generic name *Mycoderma* is considered as „nomen confusum", and the new name *Mycokluyveria* is proposed. The genus is redescribed, and the few best known species are listed, with sinonyms and analitical key.

Bibliografia

Asai T., Journ. Boll. Sc. Tokyo, **39**, 1, (1918). — Brumpt E., Précis de Parasitol., (1936). — Castellani A. and Chalmers Ch., Manual of trop. med. a hyg., (1919). — Ciferri R. et Redaelli P., Annales Mycologici, **27**, (3—4), 234, (1929). — Desmazières J. B., Catalogue d. plantes etc., Lille, (1823); Rec. Trav. Soc. Sci. Agr., Lille, (1825—1826); Ann. Sc. Nat. (Bot.), serie 1, **10** 42—87, (1827). — Dodge C. W., Medical mycology, (1935). — Guilliermond A. and Tanner, The Yeast, New York, (1920). — Janin L., Les *Mycoderma*, leur rôle en pathologie. Thèse de Nancy, N. 1001, (1913). — Leberle H., Beiträge z. Kenntnis der Gattung *Mycoderma*. Diss. München, (1909). — Lodder J., Die anaskosporogenen Hefen, 1° Hälfte, Amsterdam, (1934). — Mattlet, Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **6**, 30—31, (1926). — Persoon, Mycologia europaea, sectio prima, 96, (1822). — Saccardo P. A., Michelia, vol. II, 1—38, (1880). — Vallot, Bibl. phys. écon., agosto, (1832). — Vuillemin P., Rev. Géner. d. sciences, **12** .(16), (901). — Will H., Zentrbl. f. Bakter., II° Abt., **28**, 1, (1910).

Die Systematik der Actinomyceten

von

Elio Baldacci

(*Aus dem Italienischen Kryptogamischen Institut von Pavia*)

(5.XI.1941.)

Einleitung.

Die Systematik der Actinomyceten macht gegenwärtig noch eine Periode der Überprüfung und Umformung durch. In der Geschichte der Erforschung dieser Mikroorganismen finden wir zu Beginn eine kurze Periode, während welcher sie mit den Bakterien verwechselt oder als zu diesen gehörig beschrieben werden; aber fast gleichzeitig mit der aufmerksamen Untersuchung ihrer Morphologie und den ersten positiven Kulturversuchen entsteht der Gedanke einer unabhängigen und besonderen systematischen Stellung. Gleichsam als Kontrast zu ihrer Abtrennung von den Bakterien behauptet sich ihre Zugehörigkeit zu den Pilzen.

Die Phasen können heute als überholt betrachtet werden. Wenn nun im Allgemeinen eine grundsätzliche Einigung mit der Schaffung des Ordo Actinomycetales Buchanan erreicht ist, so sind jedoch die Systematik und die Nomenklatur der Actinomyceten, im engeren Sinne, von einer endgültigen Übereinstimmung noch weit entfernt. Der einzige feststehende Punkt ist, wie wir sehen werden, der nunmehr fast einmütige Wille der Forscher, die Einheit der von den ersten Verfassern (als *Actinomyces* oder mit anderem Namen bezeichneten) aufgestellten allgemeinen Gruppe nicht anzuerkennen, sondern dieselbe in mehrere Genera mit geeigneter Nomenklatur zu unterteilen.

In der vorliegenden Arbeit werden unsere Ansichten darüber und über die damit zusammenhängenden taxonomischen Fragen auseinandergesetzt. Sie entsprangen dem nunmehr seit mehreren Jahren geführten experimentellen Studium. Ausser den bereits früher durchgeführten Untersuchungen werden auch die neueren, jüngst zu Ende gebrachten Studien zusammengefasst.

Geschichtliche Übersicht der Klassifikationen der Actinomyceten

Bei den ersten Studien finden wir, dass diese Mikroorganismen in einem einzigen Genus zusammengelasst sind, das, je nach den Verfassern, als: *Streptothrix*, *Actinomyces*, *Nocardia* oder, seltener, *Oospora*, *Cladothrix* bezeichnet wird. Der Gedanke, sie in einem einzigen Genus zu vereinen, erhielt sich bis zu uns. Wir unterlassen es aber hier, diese, von mehr als einem Verfasser angegebenen Klassifikationen (Kruse in Flügge, 1896; Lachner-Sandoval, 1898; Migula, 1897; Castellani und Chalmers, 1911; Chalmers und Christopherson, 1917; Sartory, 1923; Dodge, 1935; Brumpt, 1936, usw.) zu diskutieren, da die gegenwärtigen Kenntnisse, wie im zweiten Kapitel besonders erläutert werden wird, eine morphologische und kulturelle Identität der Actinomyceten, die es zuliesse, sie in einem einzigen Genus zusammenzufassen, unbedingt ausschliessen. Desgleichen ziehen wir auch die Klassifikationen medizinischen Charakters nicht in Betracht, welche sich auf den pathologisch-anatomischen Eigenheiten der beim

Menschen und bei den Tieren hervorgerufenen Schädigungen gründen (Vorhandensein oder Fehlen von aktinomykotischen Körnchen und Drusen, Farbe derselben usw.).

In einem der ersten Studien über die Myceten des menschlichen Körpers, das bereits im Jahre 1883 im Archiv des Kryptogamischen Laboratoriums von Pavia veröffentlicht wurde, erkannten CATTANEO und OLIVA drei verschiedene Genera von Actinomyceten (im heutigen Sinne): *Streptothrix*, *Leptothrix* und *Actinomyces*. Zum Genus *Streptothrix* zählte man die fadenbildenden, verzweigten Arten mit den spiralenartig gewickelten Endästen; zur *Leptothrix* die fadenbildenden, unverzweigten und zu geraden Fäden angeordneten Arten; zum Genus *Actinomyces* die von Kalksubstanz umwickelten Fadenbildungen. Alle drei Genera wurden bei den Schizomyceten vereint.

Ebenso fassten DE TONI und TREVISAN (1889) die Actinomyceten in der Familie der Schizomycetaceae Naeg., die sich in drei Unterfamilien teilt, zusammen. In der Unterfamilie Trichogoneae [„adsunt tres status evolutiones, i.e. filamenta (individua), baculi, cocci"] war das Genus *Nocardia* enthalten, das von TREVISAN im selben Jahre mit folgender Diagnose geschaffen wurde:

„Filamenta tenuissima, evaginata, articulata Cladotricis more pseudoramosa, nunc e nucleo firmo radialiter expansa, nunc varie coalita. Arthrosporae in filamentis normalibus obvenientes, transformatione cocci singuli ortae. Est Cladothrix sine vaginis".

Als Synonyme des Genus waren genannt: *Streptothrix* Cohn, *Actinomyces* Harz, *Discomyces* Rivolta und fünf Species, darunter zwei nicht gezüchtete, waren hierselbst untergebracht (die Kombination *Nocardia Actinomyces* Trevisan inbegriffen).

LEHMAN und NEUMANN vertreten in den verschiedenen Ausgaben ihres Lehrbuches der Bakteriologie die Ansicht, dass die Erreger der Aktinomykosen, wie die Mikroorganismen der Tuberkulose, Lepra, Diphterie usw., nicht unter den Schizomyceten, im engen Sinne Platz finden sollten, sondern bei den tieferen Hyphomyceten oder in einer Übergangsgruppe zwischen den Schizomyceten und den Hyphomyceten. Während die erste Ausgabe ihres Werkes (1896) und KRUSE (in FLÜGGE, Die Mikroorganismen, 1896), der die Familie der Streptothricheae schuf, die erstere Ansicht vertreten, verfolgen LEHMANN und NEUMANN in der vierten Ausgabe (1907) desselben Lehrbuches das zweite Kriterium, indem sie nämlich die Actinomyceten als Übergangsformen zu den Hyphomyceten betrachten und sie in einem Anhang unter der Bezeichnung: Actinomycetes Lachner-Sandoval, 1898, zusammenfassen. Dieser Ordo war seinerseits in drei Genera unterteilt: *Corynebakterium*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

PETRUSCHKY (1903) schliesst im Lehrbuch von KOLLE und WASSERMAN die Actinomyceten bei den Hyphomycetes mit ein, wo er eine Familie für sich mit dem Charakter von ausserordentlich feinen Fäden unter der Bezeichnung Trichomycetes unterscheidet (vergleiche die Unterfamilie Trichoginae des TREVISAN). Darin sind vier Genera eingereiht: *Actinomyces*, *Streptothrix*, *Cladothrix*, *Leptothrix*. Dem Genus *Actinomyces* werden die, durch die Bildung von Körnchen mit in die Gewebe des Wirtstieres ausgestrahlten Keulen gekennzeichneten Arten zugewiesen; der *Streptothrix* die fadenbildenden, nicht sporenbildenden und der *Cladothrix* jene von vorwiegend bacillärem Aussehen. Bezüglich der wenigen, unter *Leptothrix* aufgezählten Arten verweisen wir auf Seite 13.

Im Jahre 1905 unterscheidet WRIGHT die, in der Kultur durch die Entwicklung in Anaerobiose gekennzeichneten und vorwiegend bacilläre Struktur aufweisenden Arten (welchen er die generische Bezeichnung *Actinomyces* beigibt) von jenen, durch die kulturelle Entwicklung in Aerobiose charakterisierten, faden- und sporenbildenden, für welche er die Bezeichnung *Nocardia* annimmt.

Das Genus *Actinomyces* findet man in der Klassifikation von ORLA-JENSEN (1909), zusammen mit *Rhizomonas*, *Corynemonas*, *Mycomonas*, in der Familie Actinomycetes, Ordo Cephalotrichinae (Schizomycetes) wieder. Von den, FOULERTON (1910) zugeschriebenen Klassifikationen mit den Unterabteilungen „majores" „minores", „brevis", werden wir im folgenden Kapitel sprechen. Im Handbuch von ENGLER erscheint die Familie der Actinomycetaceae zum ersten mal in der VII. Ausgabe (1912) mit einem Fragezeichen, das in der neueren Ausgabe (1936) verschwindet. Es werden wenige Species erwähnt.

PINOY (1913) unterscheidet wieder, auf Grund der Ergebnisse an Kulturen, zwei Genera in der Familie der Nocardiaeae n. nomen, und zwar *Nocardia* für die aeroben, fadenbildenden und sporenbildenden Spezies (vgl. WRIGHT) und *Cohnistreptothrix* für die vorwiegend bacillären, mikroaerophilen oder anaeroben Formen. Der Name dieses Genus nimmt seinen Ursprung von der von COHN untersuchten, aber nicht gezüchteten Species (*Streptothrix Foersteri*) und von der Ansicht des Verfassers über die vermeintliche Ungültigkeit der generischen Bezeichnung *Actinomyces*. Es ist hier angebracht, hervorzuheben, dass für die sogenannten aeroben Arten, mit welchen sich viele Wechselfälle taxonomischer Natur, auch neueren Datums, verbinden, HAAS schon seit 1906 die Bezeichnung *Actinobacterium* vorgeschlagen hatte, die in der Folgezeit von SAMPIETRO (1908) für zwei weiter isolierte Species bekräftigt wurde.

Durch BUCHANAN (1917) geben die Actinomyceten einem neuen Ordo der Schizomyceten: Actinomycetales den Namen, wo verschiedene Genera von fadenbildenden Mikroorganismen zusammengefasst werden. BUCHANAN (1917) verzeichnet folgende Genera: *Nocardia* und *Actinomyces* in dem bereits von WRIGHT gebrauchten Sinne, ausser *Actinobacillus* und *Leptotrichia* (bezüglich dieser zwei Genera siehe später!). Die Gültigkeit des Ausdruckes *Actinomyces* für *Nocardia*, *Streptothrix* usw. wird dann von BREED und CONN (1919) bestätigt, die sich übrigens mit den Klassifikationen von WRIGHT und von PINOY unzufrieden erklären. Im Jahre 1920 erscheint der erste Klassifikationsversuch des Ausschusses der Amerikanischen Bakteriologengesellschaft, in welchem der Ordo der Actinomycetales Buchanan in zwei Familien unterteilt ist: Actinomycetaceae mit den Genera *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Erysipelothrix*; Mycobacteriaceae mit *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Fusiformis* und *Pfeiferella*.

Noch unbeeinflusst von den amerikanischen Klassifikationen sind einige Versuche europäischer Forscher der Folgezeit. So unterscheidet WOLLEWEBER im Jahre 1921 im Genus *Actinomyces* zwei Abteilungen: *Aerothrix* und *Pionnothrix*, je nach dem Charakter der Sporenbildung (s. folgendes Kapitel!). ORSKOV (1923) zählt drei Genera auf: *Cohnistreptothrix*, *Actinomyces* und *Micromonospora* n. nomen; er kehrt jedoch die Bedeutung der zwei ersten Genera in dem ihnen bis dahin zugeschriebenen Sinn vollständig um. LANGERON (1923) schlägt *Euactinomyces* n. nomen für die faden- und sporenbildenden Species und *Cohnistreptothrix* für die anaeroben Species vor (vgl. PINOY). LIGNIÈRES (1924) seinerseits schlägt vor: *Actinomyces* für die faden- und sporenbildenden Species, *Brevistreptothrix* für die mikroaerophilen und anaeroben, bacillären und *Actinobacillus*. Von diesem letzteren Genus, das bereits von BRUMPT (1910) für einen von LIGNIÈRES und SPITZ (1904) isolierten bacillären Mikroorganismus vorgeschlagen wurde, wird im dritten Kapitel die Rede sein. Die Ausgabe des Jahres 1927 vom Handbuch von LEHMANN und NEUMANN unterteilt die Actinomycetales in zwei Familien: Proactinomycetaceae n. nomen mit *Mycobacterium* und *Corynebacterium* und Actinomycetaceae mit *Actinomyces*.

Die in den ersten Ausgaben des Handbuches von BERGEY (1923 und folgende) angenommene Klassifikation der amerikanischen Bakteriologen wird hingegen von CIFERRI und REDAELLI (1929) unter kritischen Bemerkungen beanstandet. Diese Verfasser schalten in die Tabellen der amerikanischen Klassifikation die Genera: *Cohnistreptothrix* Pinoy, *Actinobacterium* Haas und *Micromonospora* Orskov ein.

Spärliches Interesse haben die von JANKA und LACROIX (1929) vorgeschlagenen Aufstellungen mit dem blossen Genus *Actinomyces* und die im folgenden Jahre (1930) von JANKE selbst durchgeführte Modifikation derselben. Grösseres Interesse bietet die Klassifikation von PRIBRAM (1929), bei welcher der Ordo der Actinomycetales in zwei Familien unterteilt ist: Mycobacteriaceae und Actinomycetaceae, wobei das Untersuchungskriterium der Sporifikation, des Auftretens der Fadenbildungen und der Resistenz gegenüber der Färbung mit der GRAM'schen Methode verfolgt wird. Aber bloss ein Genus (*Actinomyces*) vereint noch die Actinomyceten im engeren Sinne, mit Ausnahme eines Genus *Actinomyces*, welches dann in der zweiten Ausgabe seiner Schrift (1933) in *Actinomycoides* umgewandelt wird, und in diesem Genus ist eine einzige, nicht gut definierte Species *Actinomycoides actinoides* Smith enthalten. Was die anderen Genera der Mycobacteriaceae betrifft, siehe später!

Die Klassifikation von VUILLEMIN (1931) schaltet die Actinomyceten in die Familie der Microsiphoneae ein, die ihrerseits in zwei Stämme zerfällt: Nocardieae und Sclerotricheae (= Mycobacterieae). Während dieser Autor zunächst die Notwendigkeit hervorhob, diese Familie in einen zu den Hyphomycetes parallelen Ordo einzugliedern, erscheint im entsprechenden Band des Jahres 1931 dieselbe Familie im Ordo der Artrosporei eingeschlossen. Nach demselben Verfasser, soll der Bezeichnung *Sclerothrix* Metchnikoff 1888 die Priorität vor jener von *Mycobacterium* zukommen; daher die verschiedene Benennung des Stammes.

JENSEN (1931) geht von einer sorgfältigen experimentellen Untersuchung aus und schlägt eine Klassifikation vor, die, unserer Meinung nach, eine klare Intuition der Systematik dieser Mikroorganismen darstellt. Die Familie der Proactinomycetaceae Lehmann und Neumann wird um ein neues Genus, *Proactinomyces*, reicher, dessen Name sich direkt von jenem der Familie hergeleitet hat und das die Actinomyceten enthält, welche mit einem Mycelienapparat versehen sind, jedoch in der Kultur niemals Sporen bilden. Die Familie der Actinomycetaceae dagegen enthält *Actinomyces* mit Sporenketten und *Micromonospora* mit einer einzigen Endspore; der Verfasser ist nicht sicher, ob er hier auch *Proactinomyces* und die mikroaerophilen Arten von bacillären Aussehen einschliessen soll.

NANNIZZI (in POLLACCI, Trattato di Micopatologia umana, 1934) unterteilt den Ordo Actinomycetales in zwei Familien: Actinomycetaceae Buchanan, 1918, mit den Genera: *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinobacillus*, *Actinobacterium*, *Leptothrichia*, *Erysipelothrix*, *Cohnistreptothrix*, *Fusiformis*, *Pfeiferella* und Mycobacteriaceae mit *Mycobacterium* und *Corynebacterium*.

PUNTONI geht im Jahre 1936 von einem experimentellen Studium aus und erkennt drei Genera an: *Actinomyces*, *Actinobacterium* und *Asteroides* n. nomen. Dieses letztere Genus enthält *Proactinomyces*, während bei *Actinomyces* die mit Sporen versehenen und bei *Actinobacterium* die anaeroben, bacillären Species eingeschlossen werden.

Im Jahre 1939 habe ich selbst meine Klassifikation bekanntgegeben, welche später auseinandergesetzt werden wird. Gleichzeitig wurde in der V. Ausgabe des Handbuches von BERGEY und Mitarbeiter das Genus *Proactinomyces* Jensen in die Familie Acti-

nomycetaceae eingeschlossen. Beim internationalen Kongress für Mikrobiologie in New York (1939) wurden die Klassifikationen von KRASSILNIKOW und von WAKSMAN vorgebracht. Ersterer gliedert in die Familie Actinomycetaceae die Genera *Actinomyces, Proactinomyces, Mycobacterium, Mycococcus* ein; in die Familie Micromonosporaceae nur das Genus *Micromonospora*. Letzterer unterscheidet hingegen vier Familien: Mycobacteriaceae mit *Mycobacterium* und *Corynebacterium*; Proactinomycetaceae mit *Cohnistreptothrix* und *Proactinomyces*; Actinomycetaceae mit *Actinomyces*, in fünf Gruppen unterteilt; Micromonosporaceae mit *Micromonospora*.

Morphologie, Taxonomie und Systematik der Actinomyceten.

Die Ungleichheit der morphologischen und kulturellen Bilder der Actinomyceten wurde, wie bereits erwähnt, auch von den ersten Forschern hervorgehoben (CATTANEO und OLIVA; PETRUSCHKY). Die, FOULERTON (1910) zugeschriebene Klassifikation hat diese morphologisch-kulturelle Heterogenität zur Grundlage und die beiden Gruppen „Saprophytica" und „Parasitica" werden ihrerseits in Unterabteilungen wiedergeteilt; die erste in „majora" und „minores" und die zweite in „majora", „minores" und „brevis". Die, in den Unterabteilungen „majora" und „minores" enthaltenen Actinomyceten zeigen, neben der Entwicklung eines reichlichen, verzweigten Mycels, Eigenschaften von Sporenbildung und von biochemischen Tätigkeiten; jene der Unterabteilung „brevis" haben kurze Hyphen oder bacilläres Aussehen, es fehlen Sporen und biochemische Tätigkeiten. Die Eigenschaften sind aber allerdings weder deutlich zu ersehen noch gründlich untersucht worden.

ORSKOV ist es zu verdanken, die morphologischen Ungleichheiten der Actinomyceten deutlich hervorgehoben zu haben. Er unterscheidet drei Gruppen, Typen oder Genera, deren Haupteigenheiten wir hier zusammenfassen:

Gruppe I.: Actinomyceten, die auf der Oberfläche des Nährbodens ein einzelliges Mycel bilden; dieses Mycel des Substrates wird von dem Luftmycel unterschieden, welches darüber, im Kontakt mit der Luft, erzeugt wird. Das Luftmycel zeigt ein vorwiegend staubartiges Aussehen und bildet sich mit grösserer Beständigkeit in den armen Kulturmedien; seine Fäden sind im Allgemeinen breiter und verzweigter als jene des Mycels des Substrates. Das Protoplasma der Luifhyphen teilt sich nach einem gewissen Zeitraum in gleiche Teile, welche untereinander durch eine Einschnürung der Hyphenhaut getrennt werden. Diese Teile erscheinen oval, kugelig oder zylindrisch und, im Vergleich mit dem Mycel des Substrates, sind sie den äusseren Einflüssen gegenüber widerstandsfähiger. Aus diesen Gründen und wegen der Modalitäten ihrer Bildung werden sie als „Sporen" angesehen.

Gruppe II.a: Actinomyceten, welche zu Beginn ein ungeteiltes Mycel bilden, das sich wegen seines polymorphen Aussehens von jenem der Actinomyceten der vorhergehenden Gruppe unterscheidet. Die ersten Lufthyphen entstehen frühzeitig, sind aber vom Mycel des Substrates nicht zu unterscheiden; nach einem gewissen Zeitraum werden sowohl das Mycel des Substrates als auch das Luftmycel mittels, von der Hyphenhaut stammender Septenbildungen in Fragmente zerteilt. Die Fragmente sind von verschiedener Form und Grösse und mit keiner grösseren Widerstandsfähigkeit gegenüber den äusseren Einflüssen versehen, wie es die Sporen der ersten Gruppe sind. Der Verfasser nennt sie „final cell", da sie zu einem Zeitpunkt auftreten, in welchem das Wachstum der Kolonie bereits aufgehört hat.

Gruppe II.b: Die Actinomyceten dieser Gruppe unterscheiden sich von den vorhergehenden durch das Fehlen des Luftmycels, während sie mit ihnen die Bildung eines anfänglich ungeteilten Mycels und seine folgende Fragmentierung gemeinsam haben. Einige dieser Actinomyceten zeigen die Neigung zu einer besonderen Entwicklung, die

der Verfasser „winkelige Entwicklung" nennt und die Analogien zu jener des *Mycobacterium* und *Corynebacterium* aufweist.

Gruppe III.: Zu dieser Gruppe rechnet der Verfasser bloss eine Species, die *Streptothrix chalceae*, die in der mykologisch medizinischen Literatur sehr umstritten ist, und begründet das neue Genus *Micromonospora*. Dieses ist durch die Gegenwart eines zarten, einzelligen und verzweigten Mycels gekennzeichnet und an den Enden seiner Hyphen bildet sich eine isolierte ovale Spore.

Jensen (1931—33) gibt einen genauen Bericht mit dem folgenden Entwicklungsgang bis zu den Ansichten von Orskov, indem er drei Gruppen oder Genera unterscheidet, von welchen die erste mit der ersten Gruppe Orskova identisch ist, jedoch unter Hinzufügung einer Untergruppe. Die Eigenheiten dieser Untergruppe sind folgende:

Die Sporen des Luftmycels spriessen und verursachen die Bildung eines Mycels, das, statt ganz zu bleiben, sich unter einem besonderen Vorgang teilt. Die entstandenen Körper können als lineare, mit vollen und leeren Hyphenzonen abwechselnde Züge erscheinen oder diphtereibe, kokkoide oder, den „Vierhyphensporen" von Lieske ähnliche Formen annehmen.

Die zweite Gruppe Orskovs wird von Jensen anerkannt, der allerdings der Unterteilung in zwei Untergruppen keine Rechnung trägt; der Verfasser glaubt hier auch viele Species von *Mycobacterium* und *Corynebacterium* einschliessen zu müssen und verleiht dem Genus den neuen Namen von *Proactinomyces*. Schliesslich wird auch die dritte Gruppe Orskovs von Jensen zur Gänze anerkannt; dieser hat sogar die Gelegenheit, sie mittels, vom Nährboden isolierter Stämme zu untersuchen. Er stellt ihre Eigenschaften, wie folgt, fest:

Das Mycel des Substrates ist aus langen, zarten und verzweigten Hyphen zusammengesetzt; die Sporenbildung ist der Ektoconidienerzeugung der Bakterien ähnlich. Die Sporen werden von seitlichen kurzen Zweigen getragen, haben kugelige oder ovale Form und sind den äusseren Einflüssen gegenüber widerstandsfähig.

Was die Eigenschaften von Aerobiose und Anaerobiose der Actinomyceten und die Länge ihrer Hyphen betrifft, wurde bereits erwähnt, dass viele Verfasser sie nicht als für die Unterscheidung geeignete Elemente ansehen, wobei sie der Ansicht sind, dass es sich um kulturelle Anpassungen handelt, die für eine Systematik der Genera nicht in Betracht gezogen werden könnten. So spricht sich Orskov nicht über die Notwendigkeit aus, eine besondere Gruppe von Actinomyceten zu unterscheiden, die sich unter anaerobiotischen Bedingungen entwicklen und schliesst einen Stamm derselben in seine zweite Gruppe ein. Obwohl Jensen die Frage „sub judice" betrachtet, neigt er dazu, die pathogenen Actinomyceten mit kurzen Hyphen, mit Bezug auf die verschiedenen Species, in die erste oder zweite Gruppe einzuschliessen. Sampietro (1908) hatte bereits drei Typen unterschieden: I. Typ „Levy", absolut anaerob; II. Typ „Wolf-Israel" mit Bevorzugung der Anaerobiose; III. Typ „Hayo-Bruns" mit Bevorzugung der Aerobiose. Diese Unterscheidung besagt letzten Endes wenig. Lignères (1924) vereinigt in einem Genus (*Brevistreptothrix*) die anaeroben Species mit kurzen Fäden. Ciferri und Redaelli (1929) halten zweckmässiger das *Actinobacterium* von der *Cohnistreptothrix* unterschieden und sehen *Brevistreptothrix* als Synonym für *Actinobacterium* an. Negroni (1934) zählt einige anaerobe Formen zum Genus *Proactinomyces*, was er jedoch später (1937) nicht mehr einhält. Im Jahre 1939 schliesslich unterscheidet derselbe Verfasser dagegen drei Gruppen: I. Hyphomycetoide Species mit gut entwickeltem, zunächst ganzem und dann segmentiertem Mycel; dicke Fäden, in welchen man Körperchen unterscheiden kann, die den Körnern der Eumycetes ähnlich sind; II. bakteroide Species mit kurzen und

feinen Elementen, wie im *Corynebacterium*; III. Zwischenspecies mit verzweigten Fäden.

Schon seit 1939 habe auch ich darauf bestanden, zwei verschiedene, diese mikroaerophilen Actinomyceten einschliessende Genera aufrecht zuerhalten.

Man würde annehmen, dass der Besitz der oben ausgeführten Beobachtungen und experimentellen Grundlagen die taxonomische Definition der einzelnen Actinomycetengruppen leicht machen könnte; in Wirklichkeit ist sie jedoch Gegenstand von Meinungsverschiedenheiten gewesen, die das Problem nicht wenig kompliziert gestalteten.

Wir halten die Diskussion über die Ungültigkeit von einigen generischen Bezeichnungen (*Streptothrix*, *Nocardia*, *Oospora*) für überflüssig; diesbezüglich verweisen wir auf die Verfasser, die uns vorausgingen, und besonders auf Buchanan. Analysieren wir hingegen, welcher Gruppe unter den im Vorstehenden analysierten die generische Bezeichnung von *Actinomyces* gebührt. Es ist bekannt, dass Harz (1877), der Schöpfer der Terminologie *Actinomyces bovis*, den Mikroorganismus nicht gezüchtet hat, sondern ihn nur, auf Grund des bakterioskopischen Befundes, in den parasitierten tierischen Geweben identifizierte. Daraus geht also hervor, dass die generische Bezeichnung, die der einen statt der anderen der beiden obgenannten Gruppen beigegeben wird, absolut konventionell ist. Mann kann diese Bezeichnung, wie es geschehen ist, unter Verfolgung verschiedener Kriterien anwenden:

a) Man kann die Nomenklatur von *Actinomyces* jener Gruppe beigeben, in welche die Species eingeschlossen werden muss, die der, nach der Schaffung der Harz'schen Bezeichnung zeitlich zuerst isolierten Kultur entspricht.

b) Man kann die generische Nomenklatur von *Actinomyces* der Gruppe verleihen, deren Species häufiger bei den Isolierungen aus Fällen von Aktinomykose auftreten, in der Annahme, dass Harz mit grosser Wahrscheinlichkeit auf eine derselben gestossen ist. Wie bekannt, wird dieses Kriterium von Wright, von Buchanan und von den amerikanischen Autoren, nicht aber vom Komitee der amerikanischen Bakteriologen vertreten.

c) Man kann die, nunmehr durch den Gebrauch und durch ein unter den Mykologen vorherrschendes Übereinkommen bekräftigte Bezeichnung annehmen, welche den Ausdruck *Actinomyces* auf die Arten mit den Eigenschaften der I. Gruppe von Orskov und von Jensen bezieht.

Das erste der obgenannten Kriterien bietet keine leichte Lösung des Problems. Wenn man sich nach den bibliographischen Forschungen richtet, so wäre die erste Actinomycetenkultur von O. Israel (1884) ausgeführt worden. Aber es handelt sich nur um eine vorläufige Mitteilung, aus welcher die wirklichen Eigenschaften des Mikroorganismus nicht leicht feststellbar sind und aus welcher nicht hervorzugehen scheint, dass dieser als gleich oder verwandt zu dem, später von M. Wolf und von J. Israel (1891) isolierten angesehen werden könne. Die Mitteilung von O. Israel (der das Material von J. Israel erhielt) ist, wie gesagt, vom Jahre 1884, während ein Jahr darauf Bostroem (1885) ankündigte, dass es ihn gelungen wäre, einen Actinomyceten zu züchten, von welchem er in einer nachfolgenden Arbeit vollständige und ausführlich beschriebene Eigenschaften angab. Dank einer vor kurzer Zeit gemachten Entdeckung, konnte ich feststellen (1937), dass dieser Actinomyces in die I. Gruppe von Orskov und Jensen eintreten muss.

Das zweite Kriterium würde zur Annahme der Bezeichnung *Actinomyces* für die anaeroben und bacillären Arten führen, wenn man sich auch noch nicht gänzlich darüber einig ist, ob sie ein einziges oder mehrere Genera bilden, ob sie in die Gruppe I. und II. der bereits mehrmals angeführten Verfasser eingeschlossen werden oder eine für sich

stehende Gruppe (oder ein Genus) darstellen sollen. Die Frage bliebe also noch ungelöst und alles eher als klar.

Das dritte Kriterium löst, unserer Meinung nach, am besten die komplizierte taxonomische Frage. In der Tat erleichtert uns die schon vorher von Mykologen und Mikrobiologen zu dieser Lösung gegebene Zustimmung die Aufgabe. Mit diesem Kriterium folgen wir der Meinung von GASPERINI (1892—1894), von KRAINSKY (1914), von WAKSMAN und CURTIS (1918), von MILLARD und BURR (1925), von WOLLENWEBER (1923), von JENSEN (1930), von PUNTONI (1931), von DUCHÉ (1934) und, für fast alle Species, jener, die von BERGEY in seinem Handbuch vertreten wird. Es gibt keinen, der nicht den grossen Vorteil einer solchen Lösung, welche sehr viele der bekannten Actinomycesarten bei ihrem ursprünglichen Binom belässt, einsehe. Ausser den amerikanischen Autoren, die zur zweiten Lösung neigen, macht ORSKOV eine Ausnahme, der seine erste Gruppe mit dem Namen *Cohnistreptothrix* bezeichnete. Es scheint jedoch, dass der Verfasser selbst dieser Nomenklatur keine Bedeutung beigemessen hat, da er in einer neuerlichen Arbeit (ORSKOV, 1938) auf dieses Argument nicht mehr zurückgekommen ist. Bezüglich der Kritiken zu dieser Frage verweisen wir auf die Arbeit von CIFERRI und REDAELLI (1929).

Die Diagnose des Genus *Actinomyces* ist also folgende:

„Actinomyceten, die ein vollkommenes vegetatives, dem Substrat anliegendes Mycel von wächsernem Aussehen, mit verzweigten Fäden von Dimensionen von unter einem Mikron bilden; davon entspringt ein Luftmycel von im Allgemeinen staubförmigem Aussehen, gefärbt oder weisslich, mit Fäden, die breiter sind als jene des Substratmycels und in welchen sich an den Enden Sporenketten unter verschiedenen Modalitäten und von verschiedener Form (oval, rund, oder zylindrisch) bilden. Sie entwickeln enzymatische und biochemische Fähigkeiten und finden sich im saprophytären und parasitären Zustand beim Menschen, bei den Tieren und bei den Pflanzen."

Die zweite Gruppe von ORSKOV und von JENSEN heisst *Proactinomyces*; dieser Name wurde ihr von letzterem geben, da die vorher von ORSKOV gebrauchte Terminologie (*Actinomyces*) bereits ihre Zuweisung gefunden hatte. Die von PUNTONI (1937), unter der Bezeichnung *Asteroides* verwendete muss als Synonymie betrachtet werden, wie von mir auseinandergesetzt (1937) und von PUNTONI selbst anerkannt wurde.

Die Diagnose von *Proactinomyces* lautet folgendermassen:

„Actinomyceten, die ein vollständiges vegetatives Mycel, das nicht dem Substrat anliegt, körnig und bröckelig, verschieden gefärbt und mit verzweigten Fäden von Dimensionen von unter einem Mikron versehen ist, sowie auch ein Luftmycel bilden, das jedoch vom ersteren nicht zu unterscheiden ist. Sowohl das eine als auch das andere teilen sich mittels, von den Hyphenmembranen stammender Septen in Fragmente, die wegen ihrer Unfähigkeit, den äusseren Einflüssen mehr als das Mycel selbst Widerstand zu leisten, nicht als Sporen angesehen werden können. Die entwickelten enzymatischen und biochemischen Tätigkeiten sind spärlich oder unerheblich. Sie befinden sich im saprophytären und parasitären Zustand beim Menschen und bei den Tieren; sie werden in nicht sicherer Weise als Pflanzenparasiten verzeichnet."

Die dritte Gruppe der oben erwähnten Verfasser wird vom Genus *Micromonospora* gebildet, worüber keine Diskussionen bestehen. Die Diagnose lautet folgendermassen:

Actinomyceten, die ein vollständiges vegetatives Mycel mit langen, zarten und verzweigten Hyphen von Dimensionen von unter einem Mikron, sowie ein Luftmycel, bei welchem man auf den seitlichen Zweigen Haupthyphen, einzelne isolierte, ovale oder kugelige Sporen unterscheidet, bilden. Sie entwicklen spärliche enzymatische und

biochemische Tätigkeiten. Sie finden sich im saprophytären Zustand und, vielleicht bei einer Species, im parasitären Zustand bei den Tieren."

Schliesslich verbleibt, was die sogenannten mikroaerophilen Actinomyceten betrifft, die Frage ihrer Eingliederung in eine oder beide vorhergehende Gruppen; diese Meinung wurde von einigen Verfassern, jedoch ohne experimentelle Grundlagen, ausgesprochen. In der Tat kann eine, auch auf Grund von experimentellen Untersuchungen behauptete (Morelli, 1929) und durch die Wirkung geänderter Lebensbedingungen beim Übergang vom parasitären Zustand in die saprophytäre oder kulturelle Lebensweise hervorgerufene Umwandlung der anaeroben Actinomyceten mit kurzen Hyphen in aerobe, sporenbildende oder nicht sporenbildende Actinomyceten nicht aufrecht erhalten werden. Puntoni (1937) berichtete, dass er die Behauptungen der Morelli experimentell nicht bestätigt finden konnte. Die jüngst von Negroni (1939) begonnene Untersuchung, welche die mikroaerophilen Actinomyceten in drei Gruppen zusammenfasst, bestätigt das, was Ciferri und Redaelli (1929) sowie Baldacci (1939) über die Notwendigkeit behauptet hatten, wenigstens zwei Genera, und zwar *Actinobacterium* Haass, 1906 und *Cohnistreptothrix* Pinoy, 1913 zu erhalten. Es ist nicht ausgeschlossen und sogar wahrscheinlich, dass sich unter den, bei diesen Genera in Betracht gezogenen Species wirkliche Corynebakterien und *Proactinomyces* befinden; aber nur die Untersuchung der einzelnen Arten, auf Grund von genauen Vergleichselementen, wird die gewünschte Antwort bringen können.

Die Diagnose von *Actinobacterium*, von welchem *Brevistreptothrix* (s. oben!) ein Synonym ist, lautet folgendermassen:

„Anaerobe, runde oder linsenförmige, cremeartige, blasse Kolonien von bakteriellem Typus bildende Actinomyceten mit seltenen, spärlich verzweigten, mycelischen Hyphen von diphterischem Typus und von der Breite von ungefähr einem Mikron. Als Parasiten und Saprophyten bei den Tieren."

Die Diagnose von *Cohnistreptothrix* ist folgende:

„Mikroaerophile Actinomyceten mit reichlichen und gut entwickelten, verzweigten Fäden, die zunächst vollständig, dann segmentiert sind und bisweilen, den Sklerotien ähnliche Massen bilden; Fäden deren Breite ungefähr einem Mikron und mehr entspricht. Kolonien von bakteriellem Typus. Als Parasiten des Menschen und der Tiere und vielleicht auch als Saprophyten zu finden.

Analytische Schlüssel des Ordo Actinomycetales Buchanan, 1918.

Familie: Mycobacteriaceae (Chester) Baldacci, 1939.
Bilden niemals Sporen und treten im allgemeinen mit kurzen, stäbchenförmigen oder kokkoiden Elementen auf; fadenbildend sind nur die entwickelten Formen, bisweilen mit zwei untereinander undifferenzierten Myceltypen. Vorwiegend parasitisch und weniger häufig saprophytisch.

Unterfamilie: Leptotrichioideae Baldacci, 1939.
Bakteroide Formen mit spärlichen Fäden oder nur Andeutungen von verzweigten, fadenbildenden Formen.

I. Mit seltener und gelegentlicher Gegenwart von Mycelhyphen; gramnegativ.
   a) Spindelförmige Zellen . . . . . FUSIFORMIS Hoelling, 1910.
   b) Zellen von der Form von Bacillen, Kokkobacillen oder Diplokokken, bisweilen von Streptobacillen . . . . ACTINOBACILLUS Brumpt, 1910.

c) Stäbchenförmige Zellen, bisweilen fadenbildend mit Andeutungen zur Verzweigung . . . . . PFEIFERELLA Buchanan, 1916 [1]).

II. Mit häufiger Anwesenheit von Mycelhyphen; grampositiv.

a) Fäden von Stäbchenform, die dazu neigen, lange Mycelhyphen zu bilden, welche bisweilen verzweigt, verdickt und gekörnt sind . . . . . ERYSIPELOTHRIX Rosenbach, 1909.

b) Dicke, unverzweigte, bisweilen gekörnte und septierte Fäden, die in kurze Stäbchen zerfallen . . . . . LEPTOTRICHIA Trevisan, 1879.

Unterfamilie: Proactinomycoideae Baldacci, 1939.

Vorwiegend fadenbildende Formen, bei welchen mehr oder weniger rasch eine Fragmentierung der Hyphen statthat.

I. Anfänglich kurze Fadenbildungen von V, Y und X-Form (winkelige Entwicklung), die sofort in bakteroide Elemente zerfallen.

a) Säurefest . . . . . MYCOBACTERIUM Lehmann et Neumann, 1896

b) Nicht säurefest . . CORYNEBACTERIUM Lehmann et Neumann, 1896.

II. Anfangsfäden, wie früher, die jedoch ganz bleiben, unter Bildung von mehr oder weniger reichlichen Hyphen; bisweilen bildet sich ein Luftmycel, das vom vegetativen nicht differenziert ist. Die Fragmentierung findet in einem fortgeschritteneren Stadium statt, wenn das Wachstum bereits abnimmt oder innehält.

a) Streng anaerobe Formen von bacillärem Aussehen mit seltenen, spärlich verzweigten Hyphen . . . . . .ACTINOBACTERIUM Haass, 1906.

b) Mikroaerophile Formen mit reichlichen, verzweigten Fäden und bisweilen mit kleinen Sklerotienmassen . . COHNISTREPTOTHRIX Pinoy, 1913.

c) Aerobe Formen mit gut entwickeltem Mycel, das bisweilen in ein vegetatives- und Luftmycel geschieden ist; letzteres undifferenziert. PROACTINOMYCES Jensen, 1931.

Familie: Actinomycetaceae (Buchanan) Baldacci, 1939.

Formen, die Sporen oder Conidien in einem differenzierten Luftmycel von grösserer Dicke als das vegetative und mit spiraligen oder ähnlich geformten Enden erzeugen. Das vegetative Mycel bleibt fast konstant ganz. Vorwiegend saprophytische und nur bisweilen parasitische Arten.

a) Isolierte Sporen und einzelne an den Enden der Hyphen. MYCROMONOSPORA Orskov, 1923.

b) Mehrere und in Reihen angeordnete Sporen. ACTINOMYCES Harz, 1878.

Dieser analytische Schlüssel erfordert einige Erläuterungen, nicht so sehr für die schon vorher besprochenen Genera als für ihre Unterteilungen in Familien und Unterfamilien.

Die Haupteigenschaft des Schlüssels besteht in der strengen Definition, die darin für die Familie Actinomycetaceae gegeben wird. In diese werden tatsächlich nur zwei Genera von Actinomyceten, die durch die Erzeugung von Sporen oder von Conidien im (sporentragenden) Luftmycel gekennzeichnet sind, eingeschlossen. Was den Begriff der Spore betrifft, beachte man das folgende Kapitel.

Die Familie der Mycobacteriaceae umfasst dagegen sämtliche übrige Genera, bei welchen man eine negative Eigenschaft, das Fehlen von Sporen, feststellt; diese negative Eigenschaft wird übrigens bei der Bestimmung der Genera von anderen

[1]) Nach Pribram (1933) hätte die Bezeichnung *Malleomyces* Hallier das Vorrangsrecht.

positiven Eigenschaften begleitet. Diese Familie ist übermässig reich an Genera und daher haben wir es für zweckmässig gefunden, sei es in der Absicht sie zu reduzieren, sei es weil tatsächlich sehr ausgedehnte und deutliche Unterschiede bestehen, dieselbe in zwei Unterfamilien zu unterteilen. Bei der Unterscheidung der zwei Unterfamilien wurde, wie beim Schlüssel der Genera, dem Übergang von den bacillären zu den fadenbildenden Formen, d.h. zu jenen der Familie Actinomycetaceae Rechnung getragen. Es wurden besonders in der Unterfamilie der Proactinomycoideae alle fünf, im vorhergehenden Kapitel besprochenen Genera vereint, die zur zweiten Gruppe von Orskov und von Jensen gehören und bei welchen wir zu dem bereits gesagten nichts hinzuzufügen haben.

In der Unterfamilie Leptotrichoideae haben wir dagegen einige Genera zusammengefasst, die nicht alle Verfasser unter den Actinomycetales eingereiht haben wollten. Nach unserer Meinung, stellen diese Genera die Voraussetzungen des Ordo selbst, nach, beim gegenwärtigem Stand zu Tage tretenden morphologischen Verwandschaften und nicht nach solchen von philogenetischer Bedeutung dar. Dies geht besonders für das Genus *Leptotrichia* deutlich hervor: Dieses Genus wurde von Trevisan im Jahre 1879 geschaffen, wobei er die allgemeine Bezeichnung *Leptothrix* Cohn 1875 korrigierte; letztere war ungültig, da Kutzing denselben Namen schon vorher für die Algen gebraucht hatte (1845). Übrigens wurde die Diagnose dieses Genus in der Folgezeit modifiziert und die ihm zugewiesenen Species sind gering an Zahl und schlecht bekannt, während nicht überprüfte Affinitäten zu den Genera der Unterfamilie Proactinomycoideae bestehen. Die Untersuchung dieses Genus ist, unserer Ansicht nach, für die Actinomycetales interessant. Auch andere Genera, wie *Erysipelothrix* und *Actinobacillus*, weisen unzweifelhafte morphologische und pathogenetische Affinitäten zu den Actinomyceten auf und ihre Beziehungen zu den anderen Schizomycetenformen können besser bestimmt werden.

Begriff und Definition der Sporen bei den Actinomyceten.

Das Vorhandensein von, zu den „Sporen" analogen oder equivalenten Organen wurde von den ersten Forschern in den Kulturen der Actinomyceten festgestellt (vgl. Bostroem, 1890). Die Zugehörigkeit zum Genus *Oospora* (vgl. Sauvageau und Radais, 1892) ergibt sich aus der Beobachtung von Ketten kleinster, runder oder ovaler, sich leicht trennender Sporen. Nach Rossi-Doria (1892), „soll die Haut des Mycelfadens sich progressiv erweitern und abrunden, während das Protoplasma sich segmentieren und zu Sporen verdichten soll; letztere sollen dann schliesslich, wenn sie reif werden, nach Zerstörung der Scheide selbst, hinaustreten." Diese Segmentierung ist akrogen. Auch Gasperini bestätigt (1891), nachdem er (1890) die Ansicht vertreten hatte, dass „die, die höchste Stufe der Skala der artrosporen Bakterien darstellenden Species sich sehr der *Streptothrix* nähern" die Gegenwart von Septen in den vor der Sporifikation stehenden Luftfäden und schliesslich betrachtet er (1894) die Sporen der Actinomyceten als endogene Sporen. Lachner-Sandoval (1898) unterscheidet die Fragmentierungssporen von kugeligem und zylindrischem Aussehen, welche sich auf den vegetativen Hyphen bilden und eine Länge haben, die von jener der im Luftmycel durch Septierung sich bildenden Sporen verschieden ist. Vuillemin (1899) nahm an, dass die Sporen in einem Siphon entstehen und die Familie der Microsiphoneae, in welche die Actinomyceten und die Mykobakterien eingegliedert wurden, wurde an den Ordo der Artrosporei angeschlossen. Neukirch (1902) bezeichnete die Fragmentierungssporen von Lachner-

Sandoval als „Segmentierungssporen" und nannte die Segmentierungssporen „Oidiosporen", welche durch aufeinanderfolgende Protoplasmakontraktionen entstehen sollen, so dass anscheinend isodiametrische Abschnitte, von regelmässigen leeren Zwischenräumen getrennt, sich befinden. Schütze (1908) vertrat die Ansichten von Neukirch, während andere Verfasser häufiger einfach Gelegenheitserhebungen machten. Der beste Beitrag zu dieser Frage ist jener Drechsler's (1919), dessen Untersuchungen wir jedoch später auseinandersetzen werden, während Lieske (1921) einige Modalitäten des Differenzierungsvorganges der „Sporen" in den Lufthyphen erläuterte, wobei er sich den Auffassungen von Neukirch näherte. Orskov (1923) nannte „Sporen" jene, welche im Luftmycel ohne Septenbildung erzeugt werden und betrachtete die Elemente, welche durch einen Vorgang von Septierung und Fragmentierung des vegetativen — und Luftmycels, wie er den Species seiner II. Gruppe eigen ist, entstehen, nicht als Sporen. Jensen (1931) folgte den Ideen Orskovs, erhob jedoch neue Fragmentierungsvorgänge des Mycels, je nach den verschiedenen Gruppen (oder Genera), in welche die Actinomyceten geteilt wurden. Puntoni (1931) wies die Bezeichnungen von Artrospora und Conidium zurück und gab eine neue Terminologie: „Actinosporae" an, die etwas, was zwischen den Conidiensporen und den Artrosporen steht, darstellen. Sie bilden sich auf Luftfäden durch einen Septierungsvorgang. Grigoraki (1931) bekrittelte die Auffassung von Vuillemin und glich die Sporen der, für den Menschen pathogenen Actinomyceten (*A. bovis*) den Clamidosporen und Mikroaleurien an, indem er sie als von dazwischen geschalteten oder am Ende liegenden Kontraktionen des Protoplasmas, das sich in gewissen Punkten der Fäden verdichtet, erzeugt, ansah. Duché (1934) unterschied die, in den Lufthyphen erzeugten und, seiner Ansicht nach, den Mikroaleurien des Grigoraki equivalenten Sporen als „Entosporen" und die im vegetativen Mycel, in den alten Hyphen und im besonderen Organ gebildeten Sporen als „Artrosporen", „unregelmässige Artrosporen", „Massen" und „Mikroartrosporen". Nach diesem Autor, soll es auch, in Übereinstimmung mit Grigoraki, geschlechtliche Formen geben, die uns jedoch hier nicht interessieren. Im Jahre 1936 präzisierte Grigoraki seine Auffassung und gab eine Definition von der „Aleuria" und „Microaleuria" der Actinomyceten. Elišei (1940), der in meinem Institut, jedoch unabhängig von meinen Auffassungen und Untersuchungen arbeitet, nimmt die Idee des Grigoraki wieder auf.

Fast alle oben angeführte Verfasser haben der morphologischen und systematischen Heterogeneität der Actinomyceten keine Rechnung getragen, so dass ihre Beobachtungen sich auf Species, bald von *Actinomyces*, bald von *Proactinomyces* richten, ohne dass übrigens die Stämme, mit welchen sie gearbeitet haben, so gut individualisiert wären, um immer erkannt werden zu können. Die Untersuchungen von Orskov und von Jensen enthüllen dagegen die tiefgehenden morphologischen Unterschiede der beiden Genera und ihrer Fortpflanzungseigenschaften. Nach Ansicht dieser beiden Verfasser, kann die Bezeichnung „Spore" bei den Actinomyceten nur für die reproduktiven Körper des Luftmycels des Genus *Actinomyces* anerkannt werden, nicht aber für die Fragmentierungselemente des Luft- und vegetativen Mycels des Genus *Proactinomyces*.

Untersuchen wir also das Problem eingehender, indem wir von der Sporifikation des Genus *Actinomyces* ausgehen. Die grösste Zahl der Erhebungen ist Drechsler zu verdanken; die Sporen nehmen ihren Ursprung von einer Umwandlung von besonderen verzweigten Hyphen, die sich von den sterilen Hyphen des Luftmycels selbst unterscheiden: sie zeigen ein grösseres Kaliber als der Achsialfaden, von dem sie entspringen. Die Reifung der sporenerzeugenden Hyphen ist mit der Bildung von charakteristischen spiraligen Hyphen vergesellschaftet, die, von Species zu Species verschiedene Besonder-

heiten aufweisen. Es finden sich zwei Reifungstypen: ein aufrechter, dendroider, bei welchem die Entwicklungssequenz der sporenbildenden Hyphen in aufeinanderfolgender Art vor sich geht; ein hingestreckter, traubenartiger, bei welchem die Entwicklung vorwiegend simultan erfolgt. Der grösste Teil der Species weist allerdings eine Kombination der beiden Typen auf. Die Sporenproduktion ist basi-petal mit bisweilen kaum angedeuteter Septenbildung. Die Anordnung dieser Septen ist sehr wichtig, da sie, je nach der allmählichen Reifung der Sporen, verschieden erscheint. Es ergeben sich in der Tat folgende Fälle:

1) Die Septen bleiben während der Sporenreifung fast unverändert.

2) Die Septen können eine Spaltung in der Mitte zeigen und eine längs gerichtete Kontraktion der jungen Sporen, die frei werden, vortäuschen.

3) Den Punkten der Septen entsprechend, verengt sich das Mycel, schnürt sich ab und bildet gleichsam „Isthmen", welche die reifen Sporen miteinander verbinden.

Ausser diesen Fällen, gibt es noch andere, bei welchen die Septen in den sporenbildenden Hyphen fehlen oder wenigstens nicht nachgewiesen werden können. Das Protoplasma erscheint in regelmässigen Abständen kontrahiert und bildet eine nicht kontinuierliche Sporenreihe. Drechsler neigt zur Annahme, dass die transversalen Wände im ganzen Genus vorhanden seien, dass sie aber bei einigen Fällen so dünn seien, dass sie schwer als Septen zu unterscheiden sind. Diese Meinung wird durch die weitgehende Verschiedenheit der Septendicke nahegelegt, da man von ausserordentlich dicken, zu mässigen und schwer sichtbaren schreitet. Wir haben dagegen gesehen, dass Orskov behauptet, das Protoplasma der Lufthyphen teile sich in regelmässige Teile, ohne ein vorhergegangenes Auftreten von Septen zwischen den individuellen Elementen, die sich dann durch einen Vorgang der Einschnürung der Fadenwand trennen. Eine solche Divergenz kann der Beobachtungstechnik zugeschrieben werden, da Orskov auf dünnen Agarschichten gearbeitet hat, wo, wie anzunehmen ist, die Beobachtung der Bildung des primären Septums sich schwierig gestaltet.

Wenn man bei der Auslegung von Drechsler verbleibt, die uns als die wahrscheinlichste erscheint, auch weil sie sich auf eine grössere Anzahl von Species bezieht, ergibt sich, dass, wenn die Septen unverändert bleiben (wie im Falle 1), die so entstandenen Sporen „Artrosporen" sind (Sporen, die sich beim Wachstum des Thallus durch Teilung desselben gebildet haben; aus letzterem entstehen so viele Artrosporen wie viele Knoten sich gebildet hatten). Aber auch im Falle 2) und 3) können die Modifikationen des Septums, obwohl sie einen grösseren Zwischenraum zwischen Zelle und Zelle, d.h. zwischen Spore und Spore bedingen, keine „Aleurien" darstellen. Elisei verändert den Begriff von „Aleurie" und schliesst hierin unter den möglichen Bildungsmodalitäten [s. Hypothese 2)] gerade den Fall 2) von Drechsler ein, ohne übrigens diesen Autor zu zitieren oder sich auf ihn zu berufen. Aber, abgesehen davon, kann man Elisei in dieser Auffassung der „Aleurie" nicht folgen, da der leere Zwischenraum, der sich zwischen den Sporen bildet, auf die Veränderungen des Septums und nicht der ursprünglichen Hyphe zurückzuführen ist. Nun lautet die Definition, welche Elisei von der „Aleurie" gibt, folgendermassen: „Dazwischen geschaltete, seitliche oder apikale Conidien, die nicht breiter sind als die entsprechende Hyphe, eine dünne Haut besitzen und mit einem oder mit beiden Enden einem vollkommen leeren Teil der Hyphe anliegen, der durch Bruch oder Auflösung seiner Membran das Aleurioconidium freigibt." Diese Definition stimmt mit dem Vorgang der Spaltung des Septums nicht überein und um so weniger mit jenem der Einschnürung [Fall 3)], da man den leeren Zwischenraum einer Hyphe nicht jenem gleichsetzen kann, der durch eine Septummodifikation erzeugt wird. Wenn man aber

der Auffassung des ELISEI folgen sollte, so müsste die Definition der Aleurie noch verändert werden und so Gefahr laufen allgemein und ungenau, wie jene VUILLEMINS, zu werden.

Die Fälle 2) und 3), wie sie von DRECHSLER beschrieben werden, stimmen auch nicht mit der von GRIGORAKI gegebenen Definition von „Aleurie" überein, wonach die „Aleurien einkernige Sporen von oft verschiedenem Volumen sind, die sich aus der gänzlichen oder teilweisen Auflösung des Protoplasmas des Fadens und des Sporenträgers ergeben und, mit Bezugnahme auf ihre Entstehung, intern oder extern sind". In der Tat beobachtet man im Falle der Actinomyceten keine Protoplasmaauflösung, sondern eine Modifikation der Wand (Septenbildung).

Unserer Meinung nach, gehören die obgenannten Fälle [2) und 3)] dagegen noch zum Begriff der „Artrospore", da sich so viele Sporen befinden, wie viele Ursprungszellen gebildet wurden; es handelt sich höchstens um eine besondere Bildungsmodalität, die eine andere Bezeichnung innerhalb des Bereiches der Artrosporulation rechtfertigen würde (wie dies PUNTONI tat).

Der Fall von „Aleurien" — oder „Mikroaleurienbildung" (unter Annahme der Terminologie von GRIGORAKI) tritt ein, wenn sich, bei Fehlen des Septums, regelmässige Kontraktionen des Protoplasmas einstellen; ich selbst war schon seit 1938 geneigt, bei den Actinomyceten die Bildung eines solchen Reproduktionskörpers in Betracht zu ziehen (BALDACCI, CIFERRI und VACCARI ,1938) und es ist merkwürdig, dass ELISEI dies nicht verzeichnet hat.

Zusammenfassend, *unterscheidet man* im Luftmycel des *Genus Actinomyces eine regelmässige Artrosporulation, eine besondere Artrosporulation* und *eine Aleuriogenesis.* Ausgeschlossen ist eine Sporifikation durch Endosporen im Siphon. Diesen Sporulationseigenschaften wird Rechnung getragen werden können, wenn man zu einer Unterteilung des Genus wird schreiten wollen.

Im Genus *Micromonospora* ist die Spore vereinzelt, apikal und ihre Entstehungsmodalität ist (nach JENSEN) jener der Ektoconidien der Bakterien ähnlich.

Im Genus *Proactinomyces* septen und teilen sich sowohl das undifferenzierte Luftmycel als auch das vegetative Mycel in unregelmässige Segmente; diese sind jedoch mit keiner Widerstandsfähigkeit gegenüber den äusseren Einflüssen versehen und von einer grösseren Vitalitätsdauer als das gesamte Mycel, so dass die Verfasser, welche das Genus gründlich untersucht haben, für sie die Bezeichnung von Spore zurückweisen. Die Entstehungsmodalität ist einer Artrosporulation ähnlich (vgl. ORSKOV, S. 80), weshalb man sie „artrosporoide Elemente" nennen könnte.

Damit ist das Problem der Sporifikation der Actinomyceten umrissen; wir müssen jedoch noch andere, besondere, bei wenigen Species beobachtete und von JENSEN in der Untergruppe I.b. (Genus *Actinomyces*) zusammengefasste Vorgänge, sowie jene von DRECHSLER bei den alten Hyphen beschriebene erwähnen. Im ersten Fall handelt es sich um komplizierte Elemente, die, ohne ein eingehendes Studium, den Sporen schwer gleichzusetzen sind und für welche verschiedene Bezeichnungen geprägt wurden: diphteroide Körper, „Vierhyphensporen", bakteroide Körper, Conidiangien, Involutionsformen usw. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Beobachtungen der ersten Forscher durch die Gegenwart solcher Körper komplizierter gestaltet wurden; es ist jedoch sicher, dass wir doch heute recht wenig über ihre Natur und Funktion wissen. Die Hypothese, dass sie die Folge der Ernährung seien, da sie auf bestimmten Kulturböden eher als auf anderen in Erscheinung treten, dürfte noch die annehmbarste sein. Was die Erhebungen von DRECHSLER betrifft, haben sie vielleicht grössere Bedeutung, da sie dazu angetan

sind, noch einen der Irrtümer, in welche viele Forscher verfallen sind, aufzuklären. Die alten Hyphen des vegetativen Mycels gehen regressiven Erscheinungen entgegen, die das reichliche methachromatische Material zu Tage bringen, das seinerseits eine Aleuriogenesis oder Mikroaleuriogenesis vortäuscht. Ich bin der Ansicht, dass viele, auch neuere Beschreibungen und Abbildungen, schlechten Auslegungen von degenerierten Hyphen zuzuschreiben sind.

Abschliessend, erscheinen die Ansichten der Verfasser, welche dazu neigten, den Sporifikationsprozess bei den Actinomyceten einer mehr oder weniger typischen Artrosporulation gleichzusetzen, als die geeignetsten. Die Behauptung Grigorakis zu Gunsten einer Aleuriogenesis muss für den Sonderfall verstanden werden. Weniger verständlich ist, bei den modernen Ansichten, die andere Behauptung von Grigoraki über einen evolutiven Zyklus bei den Actinomyceten mit einer schizogonischen und einer sporogonischen Phase. Wir haben in der Tat bereits gesehen, dass man den Ausdruck „Spore" für die Unterteilung des vegetativen Mycels (bei *Proactinomyces*) zurückweisen muss, während letzteres beim *Actinomyces* ganz bleibt. Man kann auch die Umwandlungen (Grigoraki, 1923) eines *Actinomyces bovis* oder eines *Asteroides* in einen *Actinomyces* der Gruppe „*albus*" nur erklären, wenn man eine schlechte Kenntnis der spezifischen und generischen Systematik dieser Mikroorganismen voraussetzt.

Zusammenfassung einiger untersuchter Arten.

Die Arbeitskriterien, die wir beim Studium der einzelnen Species angewandt haben, sind folgende:

a) Kritische Prüfung der bibliographischen Elemente der Species.

b) Vorschlag der Abschaffung der spezifischen Bezeichnungen von nicht gezüchteten und von nur unvollkommen beschriebenen Species, so dass ihre Wiederidentifizierung schwer oder unmöglich oder nur willkürlich erfolgen kann.

c) Experimentelle Untersuchungen bei einer möglichst grossen Zahl von Kulturen, die sich auf die Species beziehen oder darauf bezogen werden können, mit besonderer Berücksichtigung — wenn es möglich ist — der Ursprungsstämme.

d) Präzisierung der Diagnose und Synonymie der Species.

ACTINOMYCETALES Buchanan, 1928.

Genus *Actinomyces* (Harz) Baldacci, 1939 (bezüglich der Diagnose s.S. 11).

Synonymie:

— *Discomyces* Rivolta, 1878; R. Blanchard, 1900.
— *Bacterium* Afanassiev, 1888.
— *Nocardia* Trevisan, 1889 et Auct. p.p.
— *Streptothrix* Rossi-Doria, 1891 et Auct., nec Corda, 1839, néc Cohn, 1875.
— *Oospora* Sauvageau et Radais, 1892, et Auct., néc Wallroth, 1873 et Al.
— *Cladothrix* Macé, 1888, néc Cohn, 1875.
— *Actinomyces* Auct. p.p.
— *Cohnistreptothrix* Orskov, 1923, néc Pinoy, 1913 et Auct.

Nicht gezüchtete Species:

1) *Streptothrix Foersteri* Cohn, 1875, néc Gasperini, 1890.
— *Nocardia Foersteri* (Cohn) Trevisan, 1889.
— *Actinomyces Foersteri* (Cohn) Guessow, 1914.

Die von Cohn für diesen Stamm, einen fadenbildenden, in den Tränenkanälen

Konkremente erzeugenden Bacillus, gebrauchte generische Bezeichnung wurde wegen der Priorität des Genus *Streptothrix* Corda 1839 (Hyphales, Dematiaceae) als ungültig erkannt. Zu dieser grundsätzlichen Einwendung kann man hinzufügen, dass das Fehlen eines positiven Ergebnisses der von Cohn versuchten Kulturen im Lichte der gegenwärtigen Kenntnisse keine genaue Wiedererkennung gestaltet, da man sie in gleicher Weise, angesichts der spärlichen morphologischen und ikonographischen Kennzeichen, zu den bei analogen pathologischen Fällen isolierten Species von *Leptotrichia*, *Proactinomyces* und *Actinomyces* rechnen kann.

2) *Actinomyces bovis* Harz, 1877.
- — *Discomyces bovis* Auct.
- — *Streptothrix bovis* Auct.
- — *Nocardia actinomyces* Trevisan, 1889.
- — *Nocardia bovis* Auct. p.p.
- — *Oospora bovis* Auct.
- — *Cladothrix bovis* Auct.
- — *Sphaerothilus bovis* Engler, 1907.

Die Bezeichnung *A. bovis* ist wiederholt von verschiedenen Forschern für vom Rind und vom Menschen und bisweilen auch von anderen Substraten isolierte Kulturen verwendet worden. Zuerst wurde angenommen, dass die Aktinomykose einem spezifischen Mikroorganismus zuzuschreiben wäre; so erklärt Bostroem (1890), nachdem er die bei elf Fällen von Rinderaktinomykose und bei fünf menschlichen Fällen erhaltenen positiven Kulturen erläutert hatte, eine vollkommene Übereinstimmung zwischen den bei den Menschen und bei den Tieren gefundenen Species festgestellt zu haben.

Die kritische Prüfung der bibliographischen Elemente (Baldacci, 1937) und die Untersuchung zahlreicher, unter diesem Namen in den Sammlungen (Ortese, 1931, Puntoni, 1931, Baldacci, 1937) aufbewahrter Formen führen zu denselben Schlussfolgerungen. Tatsächlich ergibt sich aus den experimentellen Untersuchungen die Heterogeneität der unter diesem Binom gesammelten Species und mittels der bibliographischen Forschung hat man die Unmöglichkeit erhoben, eine Species eher als die andere zu bezeichnen. Es ist zu bedauern, dass, trotz der Deutlichkeit der kritischen Formulierung mit der Bezeichnung von „nomen dubium" für dieses Binom und trotz der von Seiten der italienischen Verfasser (Gasperini, 1892, Sampietro, 1908, Cortese, 1931, Puntoni, 1931, Baldacci, 1937) wiederholt vorgebrachten Abschaffungsvorschläge, italienische Forscher (Ferrando und Ceruti, 1938) auf der Erhaltung des Binoms, gelegentlich eines schlecht diagnostizierten, von einem menschlichen Fall isolierten Stamm bestehen. Aber die mangelnde Vorbereitung dieser Autoren, das Argument zu behandeln, wie sie aus der Lektüre der Arbeit hervorgeht, stellt die beste Enthebung von jeder Kritik dar.

3) *Actinomyces hominis* Auct.
- — *Nocardia hominis* Auct.
- — *Streptothrix hominis* Auct.
- — *Oospora hominis* Auct.

Aus der bibliographischen Untersuchung (Baldacci, 1939) entnimmt man die Unsicherheit der Vaterschaft des spezifischen Namens (Berestneff, 1897, 1898?) und seinen willkürlichen Gebrauch für nicht gezüchtete (Streptothricosis hominis) oder verschiedene Stämme, die, zum Teil, bereits andernorts gut diagnostizierte oder schwer identifizierbare Formen betreffen (Sabrazés und Rivière, 1895; Ferré und Faguet, 1895; Hayo Bruns, 1899; Foulerton, 1910; Flexner, 1914; Rullmann, 1914; Chalmers und Christopherson, 1917; Orskov, 1923; Baynes-Jones; usw.).

Gültige Species:

1) *Actinomyces Bostroemi* (Bostroem) Baldacci, 1937.
   — *Actinomyces sp.* Bostroem, 1885—1890.
   — *Streptothrix actinomyces* Rossi-Doria, 1891.
   — *Nocardia bovis* Pinoy, 1919.
   — *Actinomyces canneus* Puntoni, 1931, nec Rossi-Doria, 1891.

Der Mikroorganismus entwickelt sich auf allen Laboratoriumsnährböden, unter Bevorzugung jener mit reichem Kohlenwasserstoff — und besonders Glyceringehalt. Das vegetative Mycel ist sehr reichlich, von rosa bis ziegelroter Farbe und aus sterilen, verzweigten, ungeteilten, hyalinen Hyphen vom Durchmesser von 0,4—0,6 μ zusammengesetzt; das Luftmycel ist spärlich und selten, so dass es niemals das kriechende vegetative gänzlich bedeckt, sondern sich darüber, unter der Form von weissen Büscheln, erhebt, die aus fruchtbarem, hyalinen Hyphen von grösserem Kaliber bestehen. Letztere sind am Ende bisweilen gekrümmt oder spiralig und mit ovalen oder runden, weissen oder leicht rosa gefärbten Sporen von der Grösse von 2—3 × 3—5 μ und mit einem lichtbrechenden Mittelpunkt versehen. Er besitzt keine biochemischen Fähigkeiten, verflüssigt nicht Gelatine, hydrolisiert nicht Stärke, zeigt eine rosa Fluoreszenz beim Wood'schen Licht und entwickelt sich spärlich in Anaerobiose.

Er wurde aus Fällen menschlicher Aktinomykose isoliert; bisher ist es nicht bekannt, dass er aus der äusseren Umgebung isoliert worden wäre (Baldacci, 1937).

2) *Actinomyces albus* (Rossi-Doria) Gasperini, 1894.
   — *Cladothrix dichotoma* Macé 1888, néc Cohn, 1875 [1]).
   — *Streptothrix Foersteri* Gasp., 1890, néc Cohn, 1875.
   — *Streptothrix n. 2 und n. 3* Almquist, 1890.
   — *Streptothrix alba* Rossi-Doria, 1891.
   — *Streptothrix nigra* Rossi-Doria, 1891.
   — *Actinomyces saprophyticus* Gasperini, 1892.
   — *Oospora Doriae* Sauvageau et Radais, 1892.
   — *Cladothrix liquefaciens* Hesse, 1892.
   — *Cladothrix invulnerabilis* Acosta et Grande Rossi, 1893.
   — *Actinomyces chromogenes* Gasperini 1894.
   — *Streptothrix gedanensis I.* Scheele et Petruschky, 1897.
   — *Streptothrix graminearum* Berestneff, 1898.
   — *Actinomyces thermophylus* (Berestneff) Mihe, néc Gilbert, 1898.
   — *Cladothrix odorifera* Rullmann, 1898.
   — *Actinomyces chromogenes* Gasp. beta alba Lehmann et Neumann, 1899.
   — *Oospora sp.* Bodin, 1899.
   — *Oospora alpha* Price-Jones, 1900.
   — *Streptothrix leucea* Foulerton, 1902.
   — *Streptothrix candida* Petruschky, 1903.
   — *Streptothrix Lathridii* Petruschky, 1903.
   — *Streptothrix Dassonvillei* Brocq-Rouseau, 1907.
   — *Streptothrix sp.* Caminiti, 1907.
   — *Streptothrix pyogenes* (Caminiti) Chalmers et Christopherson, 1916.
   — *Actinomyces albus* Tarozzi, 1909.
   — *Actinomyces albus* Krainsky, 1914.
   — *Streptothrix Tarozzii* Miescher, 1917.

[1]) Der von Cohn beschrieben Mikroorganismus bezieht sich auf Species von Chlamidobacteriales und, genau gesagt, auf *Sphaerothilus dichotomus* (Cohn) Migula, 1900.

— *Streptothrix Sanninii* Ciferri, 1922.
— *Nocardia Nicollei* Delanoë, 1928.
— *Actinomyces Almquisti* Duché, 1934.
— *Actinomyces Gougerotı* Duché, 1934.
— *Nocardia silvodorifera?*

Zweifelhafte Synonymie:

— *Oospora Metchnikowi* Sauvageau et Radasi, 1892.
— *Oospora Guignardi* Sauvageau et Radasi, 1892.
— *Streptothrix alba I.* Sanfelice, 1904.
— *Oospora pulmonalis* Roger, Sartory et Bory, 1909.
— *Actinomyces albus* (Krainsky) Waksman et Curtis, 1919.
— *Hongo artrosporado* Ribeyro, 1919.
— *Oospora sp.* Sartory ,1923.
— *Actinomyces Rebeyro* Dodge, 1935.
— *Actinomyces thermodiastaticus* Bergey (1919) 1925.
— *Nocardia transvalensis* Pijper et Pullinger, 1927.

Das Mycel des Substrates ist hyalin, ungeteilt, von einem Durchmesser von weniger als 1 μ, verzweigt, bisweilen mit gewundenen Fäden mit rechtwinkeligen Verzweigungen. Das Luftmycel ist hyalin oder subhyalin, geseptet, fruchtbar, von einem Durchmesser von 1—1,4 μ, mit Fäden die hakenförmig oder spiralig enden. Die Sporen sind ovoid, weniger häufig oval, und zeigen Durchmesser von 0,6—0,7 × 1,2 μ. In der Kultur erscheint das vegetative Mycel farblos und auf der Kehrseite der Kolonie mehr oder weniger gelblich, je nach dem Alter und dem chromogenen Vermögen. Das Luftmycel ist weiss und bewahrt konstant diese Farbe. Mit dem Altern der Kultur wechselt die Farbe ihre Tonart, auch je nach den Substraten und ihren Gehalt an stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Stoffen. Die am häufigsten angenommenen Farben gehen von elfenbeinweiss zu crémeweiss, milchweiss oder gräulich-weiss. Die Luftvegetation verleiht der Kultur ein typisches kreidiges, staubartiges Aussehen, je nach der stärkeren oder geringeren Fähigkeit der Stämme, mehr oder weniger reichlich zu sporifizieren. Ein anderes Kennzeichen, das mit den Stämmen und ihrer Herkunft wechselt, ist die Fähigkeit, das Substrat zu pigmentieren; letzteres kann sogar schwarz werden. Konstant findet man Schimmel- oder Erdgeruch, der von den Kulturen ausgeht. Der Widerstand gegenüber hohen Temperaturen ist beträchtlich und kann, je nach den Stämmen, wechseln. Biochemische Fähigkeiten (Protease, Amidase, Invertase usw.) und eine rosarote Fluoreszenz bei Wood'schem Licht sind vorhanden.

Der Mikroorganismus wurde aus allen Medien isoliert, vom Wasser bis zur Luft, vom Boden, aus pathologischen Fällen der Menschen und Tiere. Es handelt sich um eine ausserordentlich verbreitete und ubiquitäre Art, die Ursache des Schimmels und auch, je nach dem Medium ihrer Entwicklung, anderer Veränderungen fähig ist.

Im Zusammenhang mit der Verbreitung und der Anpassung dieser Art kann man, obwohl hiefür sichere experimentelle Grundlagen fehlen, eine leichte Neigung zur Variation (man vergleiche die russische Arbeit von A. E. Kriss, 1937, in welche ich keine direkte Einsicht nehmen konnte) und dazu, besondere morphologische und physiologische Eigenschaften aufzuweisen, annehmen, welch letztere oft die Schaffung neuer Species mit verschiedenen Namen bedingten.

Es wurden ferner folgende Varietäten beschrieben:

Actinomyces albus var. *acidus* Neukirch, 1902.
Actinomyces albus var. *ochroleucus* Neukirch, 1902.
Actinomyces albus var. *toxica* Rossi, 1905.
Actinomyces albus var. *cretaceus* (Krüg.) Wollenweber, 1920.
Actinomyces albus var. *alpha* Ciferri, 1927.

Auch die Species *Actinomyces phenotolerans* Werkmann, 1934, ist vielleicht als eine, mit der Varietät *ochroleucus* verwandte Varietät anzusehen.

Bezüglich anderer Angaben s. Baldacci, 1939.

3) *Actinomyces sulphureus* Gasperini, 1896.
- — *Bacterium actinocladothrix* Affanassiew, 1889.
- — *Actinomyces* (*Crenothrix*) *sp.* Protopopoff et Hammer, 1890.
- — *Oospora bovis* Sauvageau et Radasi 1892.
- — *Actinomyces bovis* sulphureus Gasperini, 1894.
- — *Nocardia bovis* Harz, fide Blanchard, 1896.
- — *Streptothrix luteola* Foulerton, 1905.
- — *Streptothrix bovis* communis Foulerton, 1910.
- — *Streptothrix hominis III* Foulerton, 1910.
- — *Streptothrix bovis IV* Foulerton, 1910.
- — *Nocardia appendicis* Chalmers et Christopherson, 1916.
- — *Actinomyces bovis* Harz, fide Waksmann, 1919.
- — *Actinomyces bovis* Harz, fide Lignières, 1924.
- — *Actinomyces bovis*, fide Bergey, etc. 1939.

Bei dieser Species muss bemerkt werden, dass sie von vielen Forschern und Verfassern vorwiegend unter der Bezeichnung *Actinomyces bovis* beschrieben wurde. Baldacci (1937) konnte diese Tatsache auf Grund der, von Casperini selbst angegebenen Synonymie erklären; in der, in einer internationalen Zeitschrift veröffentlichten Arbeit befand sich neben der in Frage stehenden Synonymie ein Fragenzeichen, aber es ist offensichtlich, dass die folgenden Forscher diesem Zeichen keine Rechnung trugen.

Der Mikroorganismus entwickelt sich gut auf allen Laboratoriumsnährböden. Das vegetative Mycel ist reichlich, von gelbbrauner oder bernsteingelber, bisweilen schwärzlicher Farbe, die vom Substrat abhängt. Es befinden sich dünne, sterile Hyphen von einem Durchmesser von weniger als 1 u, die verzweigt, hyalin und ungeteilt sind. Das Luftmycel zeigt eine charakteristische schwefelgelbe Farbe, bedeckt vollständig das erstere Mycel und besteht aus fruchtbarem, breiteren, hakenförmig oder spiralig endenden Hyphen. Die Sporen sind oval, hyalin, gelblich, von einem Durchmesser von 1,5—2 μ. Der Mikroorganismus besitzt biochemische Fähigkeiten (Protease, Amidase usw.) und zeigt keine Fluoreszenz beim Wood'schen Licht; er entwickelt sich spärlich in Anaerobiose.

4) *Actinomyces carneus* (Rossi-Doria) Baldacci, 1937.
- — *Actinomyces carneus* Rossi-Doria, 1891.
- — *Actinomyces asteroides* Mac Callum, 1902, néc Eppinger, 1890.

Das vegetative Mycel ist ungeteilt, hyalin, von einem Durchmesser von 0,4—0,6 μ mit rechtwinkeligen Verzweigungen und gewundenem Verlauf. Das Luftmycel ist breiter als das erstere, von einem Durchmesser von ungefähr 1 μ, mit fruchtbaren, hakenförmig oder spiralig gekrümmten Hyphen und elliptischen, regelmässigen Sporen von 1—1,3 u In der Kultur zeigt sich ziemlich rasches Wachstum unter Bildung von unregelmässigen, erhobenen, undurchsichtigen, dem Substrat anliegenden und, je nach den Substraten, hellgelben, rosagelben bis rosafarbenen Kolonien. Ein in dieser Hinsicht typisches Aussehen ergibt sich auf dem Nährboden von Pollacci. Sehr bald bedecken sich die Kolonien mit einer weissen, kreidigen Luftvegetation, die beim Altern schmutzigweiss wird. Biochemische Fähigkeiten sind vorhanden (Protease, Amidase usw.). Schwache Fluoreszenz beim Wood'schen Licht; nur spärliche Entwicklung in Anaerobiose.

Dieser Actinomyces wurde aus der Umgebung und aus verschiedenen pathologischen Fällen des Menschen isoliert (vgl. Baldacci, 1937).

5) *Actinomyces madurae* (Vincent) Lachner-Sandoval, 1898.
— *Streptothrix madurae* Vincent, 1894.
— *Nocardia madurae* (Vincent) Blanchard, 1894.
— *Oospora madurae* (Vincent) Lehmann et Neumann, 1896.
— *Discomyces madurae* (Vincent) Gedoelst, 1902.
— *Streptothrix micetomae argentinae beta* Greco, apud Durante, 1911.
— *Actinomyces micetomae* Greco, 1916.
— *Oospora micetomae* Sartory, 1923.
— *Micrococcus Pellettieri* Laveran, 1906.
— *Oospora Pellettieri* Laveran, 1906.
— *Nocardia Pellettieri* (Laveran) Pinoy, 1912.
— *Actinomyces Pellettieri* (Laveran) Neveu-Lemaire, 1921.
— *Actinomyces Pellettieri* (Laveran) Brumpt, 1917.
— *Actinomyces ruber* Krainsky, 1914, néc S. rubra (Casabó) Kruse, 1896.
— *Nocardia Krainsky* Chalmers et Christopherson, 1917.
— *Discomyces bahiensis* P. de Silva, 1919.
— *Oospora bahiensis* (P. de Silva) Sartory, 1923.
— *Actinomyces bahiensis* (P. de Silva) Brumpt, 1927.

Zweifelhafte Synonymie:
— *Streptothrix madurae* Greco, 1916.
— *Actinomyces Sommeri* Greco, 1916.
— *Oosporae Sommeri* (Greco) Sartory, 1923.
— *Streptothrix sp.* Bloch, 1916.
— *Actinomyces Brumpti* Bordjoski et Milochèvitch, 1935.

Die vollkommene Untersuchung dieser Species wird von uns sehr bald veröffentlicht werden; hier beschränken wir uns darauf, eine kurze Zusammenfassung der sie betreffenden Angaben zu bringen. Der von V. Carter isolierte *Chioniphe Carteri* Berkeley, 1862, welcher von einigen Verfassern als Synonym der vorliegenden Species angegeben wird, ist nichts anderes als eine Verunreinigung der Kulturen, die wahrscheinlich auf eine Mucoracea zurückzuführen ist. Was andere Angaben betrifft, lese man bei Ciferri und Redaelli (1941) nach. Die *Oospora indica* Kanthack, 1892, die gleichfalls von einigen Verfassern als Synonym derselben Art angegeben wurde, ist eine für den Keim eines Falles von Madurafuss, der nicht gezüchtet wurde, vorgeschlagene Terminologie. Es ist daher auszuschliessen, dass die spezifische Bezeichnung ein Prioritätsrecht vor der, von Vincent angegebenen haben könne, da jede mögliche zweckmässige Beziehung fehlt. Wir können tatsächlich nicht Chalmers und Christopherson (1917) folgen, da der von Kanthack angegebene Namen als „nomen nudum" anzusehen ist, weil ja die blosse Gegenwart des Parasiten „in situ" uns heute (nachdem die mikrobiologische Polygenesis der Aktinomykose des Fusses eine genaue, moderne Erkenntniss ist) nicht die Sicherheit gibt, dass wir es mit der ursprünglichen Species von Vincent zu tun haben.

Zahlreich sind ferner die Stämme von Actinomyceten, die mit der spezifischen Bezeichnung von „*madurae*" versehen wurden, ohne dass übrigens ihre Kennzeichen den von Vincent angegebenen entsprächen: so z.B. die *Streptothrix madurae* Koch et Stutzger 1911 (= *Actinomyces Avadi* Dodge, 1935); *Streptothrix madurae* Solari, 1917; *Actinomyces madurae* Waksmann et Curtis, der, nach der uns durch das „Centraal Bureau voor Schimmelcultures" von Baarn zugekommenen Transplantation zu urteilen, nichts anderes als ein Stamm von *Proactinomyces asteroides* ist. Schliesslich sind einige Stämme, die für identisch oder zu dieser Species ähnlich gehalten wurden, als zu anderen

Pilzarten gehörig erkannt worden: es ist dies der Fall der *Streptothrix micetomae* Laveran, die als *Madurella micetomi* (Laveran) Brumpt, 1905 identifiziert wurde. Umstrittener ist die Frage der Stellung des *Actinomyces somaliensis* Brumpt, der zwischen dem Genus *Actinomyces* und dem Genus *Indiella* hin und her schwankt, da er in der Kultur nicht untersucht wurde. Jede diesbezügliche genaue Bestätigung ist also unmöglich.

Der *Actinomyces madurae* (Vincent) Lachner-Sandoval zeigt ein hyalines, ungeteiltes, vegetatives Mycel von einem Durchmesser von weniger als 1 μ, während das Luftmycel von grösserem Kaliber, fruchtbar und mit gekrümmten Zweigen, sowie runden oder ovalen Sporen von 1,3—1,4 μ versehen ist. Die Kolonien sind anfänglich rot, jedoch nicht auf allen Kulturböden gleich (nach unseren Ergebnissen ist der Haferagar typisch). Das Mycel des Substrates nimmt Farben von gelb bis gelbgrün an und diesem Umstand ist zum Teil die Beschreibung von Species zu verdanken, die als verschieden von jenen des Vincent angesehen wurden. Die Luftvegetation ist dagegen weissrosa und häufiger weiss gefärbt und bedeckt, je nach den verschiedenen Substraten, mehr oder weniger vollständig das vegetative Mycel. Die Species entwickelt keine sehr ausgesprochenen biochemischen Tätigkeiten; sie ist ubiquitär und wurde bei pathologischen Fällen erhoben (aktinomykotisches Mycetom des Fusses vom Typus des „Madurafusses").

6) *Actinomyces viridis* (Lombardo Pellegrino) Dodge, 1935.
- — *Streptothrix viridis* Lombardo Pellegrino, 1903.
- — *Actinomyces viridochromogenes* Krainsky, 1914.
- — *Actinomyces viridochromogenes* (Krains.) Waksmann et Curtis, 1919.
- — *Actinomyces viridis* Millard et Burr, 1926.
- — *Actinomyces viridis* Duché, 1934.

Zweifelhafte Synonymie:
- — *Actinomyces alboviridis* Duché, 1934.

Die Species ist drei Mal als neue Species, unter derselben Bezeichnung, und ein viertes Mal mit einem verwandten Namen beschrieben worden. Das Mycel des Substrates ist hyalin, ungeteilt, mehr oder weniger regelmässig verzweigt; das Luftmycel ist hyalin oder subhyalin, geseptet, fruchtbar und mit spiralig endenden Fäden und ovoidalen Sporen vom Durchmesser von 0,7—1,4 μ versehen. In der Kultur ist die Kolonie zunächst dunkelgrau; dann, wenn sie sich mit der Luftvegetation bedeckt, wird sie weiss und darauf graugrün oder grau-blau. Die Pigmentierung des Substrates ist beträchtlich; die biochemischen Tätigkeiten sind spärlich. Die Species ist auf dem Boden verbreitet und für die Kartoffelknollen pathogen.

7) *Actinomyces melanosporeus* Krainsky, 1914.
- — *Actinomyces salmonicolor* Millard et Burr, 1926.
- — *Actinomyces melanogenes* Rubentschik, 1928.
- — *Actinomyces melanoroseus* Issatschenko, 1929—1937.
- — *Actinomyces Krainskyi* Rubentschik, 1930, nec Chalmers et Christopherson, 1917.

Zweifelhafte Synonymie:
- — *Streptothrix melanotica* Price-Jones, 1903.
- — *Actinomyces melanocyclus* Krainsky, 1914.
- — *Streptothrix verrucosa* Miescher, 1917.
- — ? *Actinomyces verrucosus* Adler, 1904, fide Nannizzi.
- — *Proactinomyces salmonicolor* (den Dooren de Jong) Jensen, 1932.
- — *Mycobacterium salmonicolor* den Dooren de Jong, 1927.
- — *Flavobacterium salmonicolor* (den Dooren de Jong) Bergey, 1930.

Diese Species wurde vor kurzem bei einem, jüngst vom Menschen isolierten Stamm untersucht (Baldacci, 1938). Die eben angeführte Synonymie ist das Ergebnis einer weiteren bibliographischen Forschung (wir sind hierfür dem Herrn Kollegen, Prof. Verona, der uns einige wichtige Angaben lieferte, zu Dank verpflichtet). Da ich vom „Centraal Bureau v. Schimmelcultures" von Baarn die Transplantation des Original stammes von Millard und Burr bekommen hatte, konnte ich seine Identität mit dem von mir isolierten Stamm, auch Dank der auf Haferagar und Traubenzuckeragar erhaltenen Sporifikation, feststellen. Die zwei amerikanischen Verfasser schreiben, dass sie niemals die Erzeugung des Luftmycels erhielten, und angesichts seines Mangels, hatten sie die Species als neu bezeichnet. Da die Eigenschaften der Actinomyces im nicht sporulierenden Stadium mit den von Jensen für den *Proactinomyces salmonicolor* — eine ehemals den Mykobakterien und den Flavobakterien zugeteilte Species — angegebenen übereinstimmen, ist es anzunehmen, dass die beiden Arten verwandt, wenn nicht identisch seien. Dies wird in erschöpfender Weise durch den experimentellen Vergleich, der im Gange ist, festgestellt werden können. Was die Stämme von Rubentschik und von Issatschenko betrifft, so spricht sich Rubentschik selbst in einer Arbeit des Jahres 1933 für ihre Identität aus. Derselben Meinung ist Morowitz-Wlassowa (1936).

Bezüglich der *Streptothrix melanotica* und der *Streptothrix verrucosa* konnte ich keine sicheren Elemente für die Synonymie sammeln. Diese Unsicherheit könnte eine Diskussion über die Notwendigkeit einer Revision der spezifischen Bezeichnung der Species, dem Prioritätsprinzip gemäss, erwecken. Schliesslich muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass die von Rubentschik mit dem neuen Namen *Actinomyces Krainskyi* gelieferte Bezeichnung gegen die Normen der internationalen Nomenklatur verstösst.

Das vegetative Mycel erweist sich als ganz, dünn, von einem Durchmesser von weniger als 1 μ; das Luftmycel ist dicker und mit fruchtbaren, an den Enden gekrümmten Hyphen mit Sporen von einem Durchmesser von 1,2 μ versehen. In der Kultur sind die Kolonien zunächst ziemlich typisch lachsrosafarben und später bedecken sie sich mit einer schwarzen Luftvegetation. Die biochemischen Tätigkeiten sind spärlich. Diese Species ist auf dem Boden verbreitet und wurde aus pathologischen Fällen des Menschen isoliert.

8) *Actinomyces innominatus* Baldacci, 1939.

— *Actinomyces hominis* Bostroem, fide Waksmann, 1919, néc *Streptothrix* vel *Actinomyces hominis* Auct.

Auf Grund der Untersuchung des Binoms *Actinomyces hominis* haben wir (Baldacci, 1939) dafür gesorgt, dem ursprünglich von Waksman und Curtis beschriebenen und von uns wieder untersuchten Stamm eine neue spezifische Bezeichnung zu geben. Das vegetative Mycel ist ganz, hyalin; das Luftmycel ist selten, geseptet, fruchtbar und mit gewellten, schwach verzweigten Hyphen mit ovalen Sporen von 0,7—1,1 × 1,4 μ versehen. In der Kultur bildet er weiche wachsartige, gekräuselte, anliegende Kolonien von gelbgrüner Farbe, die sich mit einem weissen, sporadisch büschelartigen Luftmycel bedecken. Er besitzt schwache biochemische Fähigkeiten und wurde aus einem Fall menschlicher Aktinomykose isoliert.

Unvollkommen beschriebene Species.

Während unserer Revisionsuntersuchung konnten wir feststellen dass einige Species, deren Beschreibung, unserem Ermessen nach, keine Identifizierung derselben mit jüngst isolierten Stämmen zulässt, für die Zwecke der Systematik als ungültig zu betrachten sind. Dies sind:

1) *Actinomyces lutero-roseus* Gasperini, 1894.
2) *Actinomyces sp.* Sabrazés et Rivière, 1895.
— *Nocardia Rivierei* Verdun, 1912.
3) *Actinomyces sp.* Ferré et Faguet, 1895 (nach den Verfassern mit *Proactinomyces asteroides* identisch).
4) *Actinomyces thermophylus* Gilbert, 1904, néc Berestneff, 1898.
5) *Actinomyces Avadi* Dodge, 1935.
— *Streptothrix madurae* Koch Stutzger, 1911, néc Vincent, 1894.
6) *Streptothrix madurae* Solari, 1917, néc Vincent, 1894.

Genus *Proactinomyces* Jensen, 1931.

Synonymie:
— *Actinomyces* p.p. Auct.
— *Asteroides* Puntoni, 1935.

1) *Proactinomyces asteroides* (Eppinger) Baldacci, 1937.
— *Cladothrix asteroides* Eppinger, 1890.
— *Streptothrix Eppingeri* Rossi-Doria, 1890.
— *Streptothrix aurantiaca* Rossi-Doria, 1891, fide Gasperini.
— *Oospora asteroides* Sauvageau et Radasi 1892.
— *Actinomyces asteroides* (Epping.) Gasperini, 1894, néc MacCallum, 1902.
— *Nocardia asteroides* (Epping.) Blanchard, 1895.
— *Actinomyces carneus* Gasperini, 1896, néc Rossi-Doria, 1891, fide Puntoni.
— *Mycobacterium asteroides* (Epping.) Lehmann et Neumann, 1896.
— *Actinomyces sp.* Horst, 1903, fide Henrici et Gardner.
— *Actinomyces sp.* Schabad, 1904, fide c.s.
— *Actinomyces sp.* Mac Donald, 1904, fide c.s.
— *Actinomyces sp.* Stokes, 1904, fide c.s.
— *Actinomyces sp.* Loehlein, 1907, fide c.s.
— *Streptothrix Freeri* Musgrave et Clegg, 1907.
— *Discomyces brasiliensis* Lindenberg, 1909.
— *Actinomyces sp.* Foulerton, 1910.
— *Asteroides asteroides* (Epping.) Puntoni, 1935.

Zweifelhafte Synonymie:
— *Actinomyces sp.* Ferré et Faguet, 1895.
— *Actinomyces cerebriformis* Namylowski, 1912.

Das vegetative Mycel ist dünn, hyalin und zerfällt bald in Elemente verschiedener Grösse, bis zu Kokkoiden, von der Breite von 0,2—0,4 μ; das Luftmycel ist spärlich, selten, unbeständig, mit kurzen, leicht gewellten, sterilen Hyphen; grampositive Elemente. In der Kultur wächst der Mikroorganismus langsam unter Bildung von unregelmässigen, gekräuselten, nicht anliegenden, bröckeligen, gelb-rosa, rot und ziegelrot gefärbten Kolonien. Er besitzt keine biochemischen Fähigkeiten, ist für die Tiere und für den Menschen pathogen. Zahlreich sind die Formen, die zu dieser Species gerechnet wurden oder gerechnet werden können; es sind auch einige Varietäten bekannt. Diese sind:

Proactinomyces asteroides var. *gypsoides* (Henrici et Gardner) Baldacci, 1937.
Proactinomyces asteroides var. *crateriforme* Baldacci, 1937.
Proactinomyces asteroides var. *decolor* Baldacci, 1937.

Nach Henrici und Gardner (1921) ist es möglich, eine Reihe von säurefesten Actinomycetenstämmen so abzuordnen, dass man an das eine Ende den *Proactinomyces asteroides* und an das andere den *Proactinomyces* var. *gypsoides* stellt, letzterer soll sich

mehr von den säurefesten Bakterien entfernen, welchen dagegen die Species näherstent.

Eine weitere Revision der Species dieses Genus, die zu den bekanntesten und zum Teil zu den Mykobakterien gerechneten gehören, mittels einer vollkommenen, nach dem heutigen Stand der neuen systematischen Ansichten ausgeführten Untersuchung erweist sich als immer notwendiger.

Riassunto

L'autore, dopo una sintesi storico-critica sugli Actinomiceti, sulla base di proprie ricerche sperimentali recenti e passate, formula la diagnosi moderna dei generi *Actinomyces*, *Micromonospora*, *Proactinomyces*, ecc. fornendo inoltre una moderna chiave sistematica per tutte le Famiglie, Sottofamiglie, e Generi degli Actinomycetales Buchanan. Di particolare importanza è la discussione sulla natura dei corpi riproduttivi degli Actinomiceti ed in genere sulla morfologia che sta a base della sistematica.

Include la descrizione accurata di alcune delle principali specie, revisionate dal punto di vista storico-critico e sperimentale; queste specie sono provviste della completa sinonimia (*Actinomyces Bostroemi*, *A. albus*, *A. sulphureus*, *A. carneus*, *A. Madurae*, *A. viridis*, *A. melanosporeus*, *A. innominatus*, *Proactinomyces asteroides*).

Sumario

El Autor, después de una síntesis histórico-critica sobre los Actinomicetos, en base a sus proprias buscas experimentales actuales y passadas, formula la moderne diagnosis de los géneros *Actinomyces*, *Micromonospora*, *Proactinomuces*. etc., integrando, además, su estudio con una llave analitica moderna de todas las Familias, Subfamilias y Generos de los Actinomycetales Buchanan. De particular importancia es la discusión sobre la naturaleza de los cuerpos reproductivos de los Actinomicetos, y, más generalmente, de la morfologia que está a la base de su sistematica.

El Autor incluye la descripción cuidadosa de unas principales especies, reexaminadas desde el punto de vista historico-experimental, con sus completa sinonimia. Estas especies son *Actinomyces Bostroemi*, *A. albus*, *A. sulphureus*, *A. carneus*, *A. Madurae*, *A. viridis*, *A. melanosporeus*, *A. innominatus*, y *Proactinomyces asteroides*.

Summary

Before the modern definition of the genere *Actinomyces*, *Micromonospora* and *Proactinomyces*, a historical-critical review of Actinomycetes (ray-fungi), based on personal, present and past, researches, has been made. A modern, analytical key for all Families, Subfamilies and Genera of Actinomycetales Buchanan, has been furnished. Of particular importance is the discussion on the reproductive bodies and on the general morphology, fundamental for the taxonomy of Actinomycetes.

A few, selected, most important species are accurately described (with sinonimy) and discussed from the historic-experimental points of view, namely: *Actinomyces Bostroemi*, *A. albus*, *A. sulphureus*, *A. carneus*, *A. Madurae*, *A. viridis*, *A. melanosporeus*, *A. innominatus* and *Proactinomyces asteroides*.

Literaturverzeichnis

Wir beschränken uns auf die bibliographischen Angaben der in unserem vorhergehenden, in derselben Zeitschrift erschienenen Veröffentlichungen nicht angeführten Verfasser.

Baldacci E., Mycopathologia, **1**, 68—76, (1938); **1**, 271—272, (1939); **2**, 43—47, (1939); **2**, 84—106, (1939); **2**, 130—136, (1939); **2**, 145—161, (1940); **3**, 42—43, (1941). — Baldacci E., Ciferri R. e Vaccari E., Atti Istit. Bot. Univ. Pavia, **11**, 75—103, (1938). — Breed R. and Conn H. J., Journ. Bacter., **4**, 535—602, (1919). — Buchanan R. E., Journ.

Bacter., **2**, 155—164 u. ff., (1917). — Cattaneo A. e Oliva L., Arch. Labor. Crittogamico Pavia, **5**, 48—142, (1888). — Ciferri R. e Redaelli P., Mycopathologia, **3**, 182—202, (1941). — Elisei F. G., Atti Istit. Bot. Univ. di Pavia, **12**, 201—211, (1940). — Engler A., Syllabus der Pflanzenfamilien, (1912 u. 1936). — Ferrando M. e Ceruti, A., Giorn. Batt. e Immunol., **21**, (3), (1938). — Grigoraki L., Rev. de Mycologie, **1**, 37—39, (1936). — Horowitz-Wlassowa L. M., CentrBl. f. Bakt., II Abt., **93**, 347—358, (1935). — Issantschenko B. L., recens. in CentrBl. f. Bakter. II. Abt., **100**, 172, (1939). — Janke A. e Lacroix H., CentrBl. f. Bakter II Abt. **79**, 161—167, (1929). — Langeron M., Les mycétomes., Nouveau Traité de méd., (1922). — Migula W., System der Bakterien, (1897). — Orla-Jensen S., CentrBl. f. Bakter., II. Abt., **22**, 305—346, (1909). — Rubentschik L., CentrBl. f. Bakter., II. Abt., **76**, 303—314, (1928); **88**, 186—193, (1939). — Vincent H., Ann. Inst. Pasteur, Paris, **8**, 129—151, (1894). — [1]).

[1]) Die auf *Actinomyces madurae* sich beziehende Bibliographie wird in einer nächsten Arbeit ausführlich angeführt werden.

ERRATA-CORRIGE

p.	25	rige	33	sperigeni	leggi	sporigeni
„	27	„	1	imceli	„	miceli
„	27	„	10	Coccidiaceae	„	Coccidioidaceae
„	40	„	6	q	„	
„	52	„	1	varazioni	„	variazioni
„	52	„	2	diverste	„	diverse

Gli Editori di MYCOPATHOLOGIA si sono fatti promotori per la costituzione di una Società Internazionale di Micopatologia: sono attualmente in corso trattative per dare a questa società una veste e un programma definiti. In uno dei prossimi fascicoli saranno precisate notizie al riguardo.

The Editors of MYCOPATHOLOGIA promote the foundation of an INTERNATIONAL SOCIETY FOR MYCOPATHOLOGY: at present are being carried on dealings in order to attribute to the new society a definite authority and programme. In one of the next numbers other explanations will follow.

Il ciclo del batterio simbionte di Blattella germanica (L.) [1]

di

Elio Borghese.

(Istituto di Anatomia umana normale e Istologia dell'Università di Pavia, diretto dal Prof. Antonio Pensa).

(Con 3 tavole).

Introduzione.

Nel 1887 il BLOCHMANN notò entro cellule del corpo adiposo e alla superficie delle uova dei due blattidi delle nostre case, la Blatta orientalis L. [2] e la Blattella germanica (L.) [3], corpiccioli a forma di bastoncino che egli suppose batterî, trasmessi ereditariamente, presumibilmente non patogeni, ma forse utili per l'organismo ospite.

Ai suddetti „batteroidi" pochi autori, che per altro non se ne occuparono a fondo (CUENOT 1896, SCHNEIDER 1902, PRENANT 1903, HENNEGUY 1904) negarono il carattere di batterî, e li ritennero prodotti cellulari; tutti gli altri hanno accettato l'interpretazione del BLOCHMANN, non ostante l'esito negativo delle culture tentate da BLOCHMANN (1887, 1892), FORBES (1892), JAVELLY (1914), WOLLMANN (comunicazione orale a LWOFF 1923), HOVASSE (1930), HOLLANDE e FAVRE (1931).

Il MERCIER (1906, 1907) ha ottenuto, dalla Blatta orientalis, culture di un bacillo mobile, peritrico, sporificante, dunque con caratteri un po' diversi da quello dei tessuti. Ma probabilmente le sue culture erano inquinate, come hanno supposto già JAVELLY e HOVASSE; ed anche lo spirillo, che il GLASER (1920) isolò dalla Periplaneta americana e dalla Parcoblatta virginica, fu riconosciuto come estraneo dal HERTIG (1921), e piú tardi dal GLASER stesso (1930). Piú convincenti, perché i caratteri dei batterî coltivati corrispondono a quelli dei tessuti, sono le culture pubblicate dal GLASER nel 1930, da materiale di Periplaneta americana e di Blattella germanica.

Lo studio citologico, compiuto da molti autori (MERCIER 1907, LWOFF 1923, WOLF 1924, NEUKOMM 1927, HOVASSE 1930, GLASER 1930, HOLLANDE e FAVRE 1931, GIER 1936), su Blatta orientalis, Blattella germanica, e Periplaneta americana, è del resto concorde nel riconoscere ai bastoncini in esame il carattere di batteri. Si tratta di bastoncini con estremità arrotondate (MERCIER), piú colorabili alla periferia e agli estremi che al centro (BLOCHMANN, NEUKOMM, GLASER), Gram-positivi (BLOCHMANN, MERCIER, NEUKOMM, GLASER, GIER), non acido-resistenti (MERCIER, GLASER, GIER). Possono mostrare uno o piú setti trasversali, piú colorabili, che sono concordemente interpretati come segni di divisione trasversale (BLOCHMANN, MERCIER, LWOFF, WOLF, NEUKOMM, HOVASSE, GLASER). Un setto può essere vicino a un estremo, separando

---

[1] L'argomento di questa ricerca mi è stato suggerito dal Prof. Raffaele Ciferri, ordinario di Botanica in questa Università, come parte a me assegnata di un complesso di ricerche, in collaborazione, sui simbionti dei blattidi.

[2] Sinonimi: Stylopyga orientalis Azam 1901, Periplaneta orientalis Houlbert 1900. Indicherò sempre le specie di blatte col nome sistematico conforme alle regole di nomenclatura (cfr.: L. CHOPARD. — Orthoptères et Dermaptères, Paris 1922, in: Faune de France), anche se gli autori citati usino un altro sinonimo.

[3] Gen. Blattella Caudell 1903. Sinonimi: Phyllodromia germanica Kirby 1904, Houlbert 1900, Finot 1890; Blatta germanica Azam 1901.

una parte a forma di bottoncino, già vista dal BLOCHMANN e interpretata da HOLLANDE e FAVRE come „gemmazione apicale".

Entro i batterî si trovano granuli secondo WOLF, HOVASSE, HOLLANDE e FAVRE; vacuoli secondo NEUKOMM, HOVASSE, HOLLANDE e FAVRE, granuli endovacuolari secondo NEUKOMM. HOLLANDE (1931) vi descrive granulazioni di urati, simili a quelle contenute nelle altre cellule del corpo adiposo.

Il batterio in questione non sporifica (HOLLANDE e FAVRE, GLASER). Le spore descritte dal MERCIER appartengono al bacillo di incerta provenienza, che egli ha trovato nelle culture. Nei batterî dei tessuti il LWOFF avrebbe osservato, solamente una volta, un'endospora; ma si tratterebbe in realtà di un comune granulo secondo il WOLF, di un vacuolo secondo il NEUKOMM.

Per molti autori, i batterî non sono tutti eguali. Il MERCIER ne nota di piú lunghi e di piú corti, in rapporto con le condizioni d'ambiente: i primi si trovano nelle blatte in buono stato di nutrizione; i corti, oltre che nelle uova ovariche, nelle blatte in inanizione o parassitate da un lievito: i batterî corti hanno uno spazio chiaro centrale. Si noti però che, prima di lui, il BLOCHMANN aveva osservato, in condizioni normali, la minore colorabilità della parte centrale. Secondo il WOLF, alcuni individui di Blatta hanno batterî spessi e corti, altri batterî lunghi: ma nelle femmine i batterî dei corpi adiposi sono piú lunghi di quelli delle uova. Per l'HOVASSE e per il GLASER, invece forme lunghe e corte sono associate: le ultime deriverebbero da una divisione recente. Forme filamentose, secondo il LWOFF, si originerebbero per mancanza del setto di divisione. Nei batterî del Mastotermes darwiniensis, che il JUCCI (1930) ritiene simili o identici a quelli dei blattidi, si trovano forme brevissime, simili a cocchi: egli le interpreta come stadî di sviluppo; il KOCH (1938) invece le crede sezioni trasversali; e il GIER ritiene le forme brevi, viste in Periplaneta americana, estremità delle forme lunghe.

La prima denominazione del batterio della Blatta orientalis spetta al MERCIER (1906): Bacillus cuenoti; ma si può discutere sulla sua validità, perché i caratteri con cui è definito sono quelli del batterio coltivato, che è tutt'altro. HOLLANDE e FAVRE (1931) propongono di mutare il nome generico in quello di Blattabacterium, per distinguerlo dal genere Bacillus che ha spore. Il GLASER (1930), avendo riscontrato affinità col gruppo dei bacilli difterici, chiama Corynebacterium periplanetae var. americana il batterio vivente nella Periplaneta americana, e Corynebacterium blattellae quello della Blattella germanica.

Quanto alla funzione dei batterî, l'esistenza costante e la trasmissione ereditaria indussero già il BLOCHMANN a ritenerli non parassiti, ma simbionti. Finora mancano però conclusioni fondate su esperienze. Il BLOCHMANN, riferendosi unicamente alla vita embrionale, riteneva che potessero agire sulla fluidificazione del vitello e piú in generale sullo sviluppo: recentemente il KOCH (1938) pensa a un possibile legame col ricambio degli urati. Il tentativo di eliminare i batteri delle blatte è stato fatto, ma invano, dal KOCH (1932, pubbl. nel 1936), che invece è riuscito, con diversi artifici, a distruggere i simbionti delle larve di Sitodrepa (1933), che diventavano nane per la mancanza di vitamine del gruppo B, e quelli di Oryzaephilus surinamensis (1936) ottenendo invece individui del tutto normali.

I batteri sono liberi solamente al momento del loro passaggio nell'uovo e nel primo periodo dello sviluppo: in tutte le altre circostanze sono contenuti entro il citoplasma di cellule del corpo adiposo, dette „micetociti" o „batteriociti". L'esistenza di batterî fuori dalle cellule, anche nell'adulto, viene considerata possibile ma eccezionale dal WOLF. I batteriociti sono normalmente al centro delle formazioni adipose: si trovano alla periferia solo nei lobuli grassi che circondano le gonadi delle larve (WOLF): ciò sarebbe dovuto, secondo tale autore, all'usura delle travate adipose dovuta al rapido accrescimento delle cellule genitali.

I batteriociti non si trovano in tutte le parti del corpo adiposo, ma sono limitati ai lobuli adiposi viscerali dell'addome (KOCH), e mancano nelle lamine periferiche (CUENOT, WOLF, KOCH). Il Wolf afferma che nelle larve, le travate adipose senza batteriociti sono piú numerose, e da ciò deduce che sono le piú giovani.

Il ciclo del batterio.

Dal corpo adiposo della *Blattella* adulta, i batterî migrano nelle uova ed entrano nel vitello. Durante lo sviluppo dell'uovo migrano dal vitello nell'embrione e vanno ad occupare cellule del corpo adiposo. Di queste due fasi è costituito il ciclo del batterio, ciclo che presenta ancora alcuni

punti oscuri, non ostante che non manchino ricerche su questa specie di blattide e soprattutto su altre, i cui risultati non possono però generalizzarsi, perché anche specie sistematicamente vicine si comportano diversamente. Due punti sono rimasti oscuri: il passaggio dei batterî attraverso la parete dell'ovario; e il primo ingresso dei batterî nelle cellule destinate a diventare batteriociti.

In queste ricerche ho seguíto il ciclo nelle sue due fasi, la prima su ovarî di *Blattella germanica* adulta, la seconda su embrioni della stessa specie in tutti gli stadî di sviluppo, cercando di ricostruirlo senza lacune. Il primo punto mi è rimasto ancora in parte oscuro; credo invece di aver chiarito il secondo, e di aver trovato il brevissimo stadio in cui avviene il passaggio dei batterî dal vitello all'embrione.

1. L'infezione ovarica.

Bibliografia.

Il BLOCHMANN, nell'ovario di Blattella germanica, non trova batteri sulle uova piú giovani; sulle uova piú progredite vede uno strato di batterî che prima si ispessisce e poi si rarefà, ed infine, prima della deposizione dell'uovo, diviene discontinuo.

Un reperto simile viene descritto per le uova ovariche di Blatta orientalis dal MERCIER (1907) e dal BUCHNER (1912).

Nell'uovo pronto per la deposizione, secondo la FRÆNKEL (1918, 1921) i batterî della Blatta sono in gran parte raccolti ai due poli; nella Blattella invece rivestono tutto l'uovo e sono appena un po piú concentrati al polo posteriore; il HEYMONS invece, in quest'ultima specie, trova due addensamenti, all'estremità anteriore e nel mezzo della faccia dorsale.

Secondo MERCIER e FRÆNKEL, nell'entrare nell'uovo, i batterî diminuiscono di grossezza, divenendo simili a quelli visti dal MERCIER in animali affamati: da ciò il BUCHNER deduce che le condizioni di vita nel vitello sono meno favorevoli che nel corpo adiposo.

Certamente i batterî dell'uovo provengono dal corpo adiposo: ma la dimostrazione obiettiva manca ancora. Il BLOCHMANN ne ricercò la via percorsa, ma non riuscí a trovarli nell'epitelio del follicolo.

Il MERCIER (1907) osserva batterî entro cellule della tunica peritoneale dell'ovario ed anche in cellule dell'epitelio follicolare, nella Blatta orientalis. Egli suppone che l'ingresso dei batterî risalga alla vita embrionale: ammette però di non aver visto l'entrata dei bacilli nell'uovo.

Il BUCHNER descrive nel 1912 batterî nelle cellule follicolari della Blatta, non però durante la migrazione, ma in uno stadio successivo, quando i batterî, raggiunto già l'uovo, regredirebbero verso il follicolo. Il reperto è un po' strano e il BUCHNER stesso, piú tardi (1921),dopo che la FRÆNKEL (1918) non era riuscita a confermarlo, pare ricredersi e ritenere di essere stato tratto in errore da sezioni oblique.

La FRÆNKEL descrive il passaggio dei batterî di Blatta orientalis attraverso la porzione a cellule piatte del follicolo: ma non avendo potuto consultare direttamente il lavoro, che trovo citato dal BUCHNER (1921, 1928) non posso dare particolari piú precisi, e non ho potuto accertarmi se l'autrice abbia visto realmente i batterî nel citoplasma.

Il GIER, in Periplaneta americana, osserva alla superficie degli oociti, batterî che penetrano nello strato superficiale e formano, nell'uovo completamente accresciuto, accumuli a forma di disco ai poli, mentre si diradano ai fianchi. Anch'egli non ha trovato batterî entro le cellule follicolari. Il GLASER invece parla di cellule follicolari „infettate", ma non dà maggiori particolari.

Si devono ricordare anche gli studî fatti dal KOCH (1938) sul Mastotermes darwiniensis, i cui batterî simbionti, scoperti dal JUCCI (1930), hanno un comportamento molto simile a quello delle blatte. Nelle operaie, il cui ovario è rimasto a uno stadio precoce, si trovano batteriociti attorno ad esso; in regine allo stadio ninfale, fra i tubi ovarici si vedono batteriociti da cui stanno uscendo i batterî per entrare nelle prime camere ovariche, e altri completamente vuoti. L'autore non ha trovato lo stadio di migrazione dei batteriociti dal corpo adiposo al tessuto periovarico.

Nell'imago giovane, ancora alata, non vi sono piú batteriociti fra i tubi ovarici, dal che l'autore deduce che la provvista di simbionti è esaurita. Egli conclude che vi sono due stadî di infezione: migrazione di batteriociti nell'ovario giovanile con passaggio di batterî nelle camere ovulari: successivamente, solo nell'imago, nuova infezione delle uova durante l'accrescimento, da parte di batterî già esistenti nell'ovariolo. I batterî, dopo uno stadio in cui ricoprono in strato multiplo tutto l'uovo, penetrano nell'ovoplasma dove formano due accumuli polari.

Simile dovrebbe essere, secondo il KOCH, il comportamento dei batterî nei blattidi, con infezione precoce attraverso la parete dell'ovario e infezione tardiva per migrazione dei batterî dalle camere posteriori alle anteriori non ancora infette; egli però non approfondisce lo studio dei blattidi, e si contenta di rappresentare, in un disegno di ovariolo di Blatta orientalis, batterî alle superficie delle uova piú grosse.

Reperti personali.

Premetto qualche notizia sui caratteri istologici dell'ovario di *Blattella germanica*. E' un ovario panoistico, cioè senza cellule nutrici. In ogni ovariolo si seguono: il filo terminale, il „germario" o camera terminale, costituita da piccole cellule ammassate, e una serie di uova di grandezza crescente, contenute in follicoli. Le prime uova sono sferiche, con citoplasma denso omogeneo, e nucleo grosso; sono rivestite da un unico strato di cellule follicolari sottili. Seguono uova allungate, in cui si va accumulando il vitello, che appare per effetto della fissazione costituito da zolle poligonali omogenee, e sforacchiato da cavità sferiche nelle quali erano contenuti lipidi, scioltisi sotto l'azione dei reagenti; il nucleo ha conservato le dimensioni dello stadio precedente. Il follicolo si è ispessito ed è costituito da cellule senza contorni riconoscibili, con nuclei disposti in due strati e scarsissimo citoplasma. Oltre l'ultimo uovo, prima di sboccare nell'ovidotto, l'ovariolo rimane per breve tratto vuoto ed è formato da un unico strato di cellule cilindriche molto alte, con piccolo nucleo e citoplasma chiaro.

Quanto è detto sopra vale per ovarî in periodo ancora lontano dalla deposizione delle uova: in ovarî piú progrediti, in cui l'ultimo uovo è piú fortemente vacuolato ed è ricoperto dal corion, il follicolo che lo riveste è formato da un solo strato di cellule appiattite. Non sono riuscito a dimostrare in questa specie una membrana vitellina, nel che concordo con WHEELER (1889) e LECAILLON (1898).

Esternamente all'epitelio del follicolo si trova la tunica propria, anista; non si riconosce in questa specie, come osservano anche IWANOFF e MESTSCHERSKAJA (1935), almeno nell' imago, una tunica peritoneale come quella di cui parla il MERCIER per la *Blatta orientalis*.

Non si trovano batterî nel germario, né attorno alle prime uova, piccole e sferiche. Le uova seguenti, ancora sferiche, ma piú grosse, avvolte da epitelio follicolare piatto, mostrano alla superficie batterî isolati, oppure uno strato unico e uniforme di batterî (fig. 1). Alla superficie delle grosse uova allungate, i batterî sono molto numerosi e costituiscono uno strato continuo e multiplo, dello spessore di almeno 3—4 batterî.

Sull'uovo sferico e sulle prime uova allungate, lo strato batterico è aderente alla superficie, ma esterno. Nell'uovo piú progredito, molto grosso e fortemente vacuolato, i batterî sono penetrati nel citoplasma (fig. 1), rimanendo però sempre in quello strato superficiale che gli embriologi (vedi ad esempio SCHNETTER 1931) considerano citoplasma puro *(Keimhautblastem)*, senza vitello.

Le uova ovariche vicine alla deposizione, rivestite dal corion, conten-

gono nello strato superficiale batterî molto meno numerosi che negli stadî precedenti, evidentemente perché l'accrescimento dell'uove è avvenuto molto piú rapidamente della moltiplicazione dei batterî. Questi non costituiscono piú un tappeto continuo e regolare, ma sono un po' piú addensati ai poli, meno sui fianchi: alcuni sono penetrati sotto la superficie, senza molto progredire. La densità dei batterî sui poli non è però grande: non si può parlare di veri cumuli come quelli descritti dalla FRAENKEL nella *Blatta orientalis*.

Come avviene la penetrazione dei batterî nell'uovo?

Lobi adiposi si trovano in vicinanza degli ovarioli; raramente però a diretto contatto; ed anche in questo caso fra i batteriociti, situati al centro dei lobi adiposi, e l'ovariolo, sono interposte le cellule adipose.

Gli ovarioli contenenti uova vicine alla deposizione sono completamente isolati: gli ovarioli meno progrediti sono invece avvolti da un tessuto ricco di trachee tra le quali sono disseminate cellule dal citoplasma omogeneo, e altre con inclusioni sferiche e bastonciniformi simili agli inclusi urici del tessuto adiposo; vi mancano le cellule adipose. Questo tessuto rappresenta una formazione intermedia fra i lobi adiposi e gli ovarioli. Molto raramente vi si trovano batteriociti, e anche in questo caso rimane il dubbio che appartengano a qualche lobo adiposo che vi si è incuneato. Di rado si trovano cellule contenenti, in un citoplasma omogeneo, pochi batterî: cellule che dovrebbero interpretarsi come batteriociti migrati dai lobi adiposi e che vanno vuotandosi dei batterî. Il reperto è tuttavia cosí raro, che non mi sento di trarne una conclusione sicura.

Sono frequenti i batterî isolati, non contenuti nel citoplasma di alcuna cellula e che si devono ritenere come liberamente migranti, dovendosi escludere, a causa della loro grande dispersione e della lontananza dai batteriociti, l'eventualità di un distacco accidentale da questi ultimi. Tali batterî liberi possono trovarsi attorno a qualunque porzione dell'ovariolo.

Può talvolta avvenire che i batterî perifollicolari costituiscano uno sciame che sembra dirigersi verso un follicolo. L'immagine, riprodotta nella fig. 2, è molto suggestiva e fa pensare a un avviarsi dei batterî al follicolo per attraversarlo: ma non è escluso che possa trattarsi di un accumulo casuale. Infatti figure simili si possono trovare anche nelle vicinanze dell'ultimo tratto dell'ovariolo, dove il passaggio dei batterî sembra improbabile; ed inoltre si deve considerare che, trattandosi di batterî estracellulari, quindi liberi nella cavità del corpo, possono facilmente venire meccanicamente spostati durante la fissazione.

La supposizione che i batterî, usciti dai batteriociti nei lobi adiposi stessi oppure dopo migrazione di tali cellule nel tessuto periovarico, passino attraverso la parete del follicolo per raggiungere l'uovo, è la piú naturale, e non se ne vede altra plausibile. Abbiamo visto sopra che il BLOCHMANN, che ha studiato questa specie, non è riuscito a darne la prova decisiva, cioè la dimostrazione dei batterî nel citoplasma delle cellule follicolari o nei loro interstizî: e neppure per altre specie di blattidi si è ottenuto un risultato non controverso. Si deve dunque pensare che ragioni tecniche impediscano la dimostrazione del passaggio dei batterî attraverso la parete.

Si può supporre che, se i batterî attraversano le cellule follicolari piatte e sottili degli stadî iniziali, sfuggano all'osservazione perché a causa dell'estrema sottigliezza della cellula il loro passaggio è molto rapido; che se invece passano per lo strato spesso dei follicoli piú progrediti, possano

non essere visibili perché il citoplasma è estremamente scarso e fortemente colorabile, mentre i batterî si colorano debolmente. Sembra che si debba escludere il passaggio attraverso l'ultimo tratto dell'ovariolo, oltre che per il fatto che l'uovo giunto a tal punto è già tutto ricoperto da una fitta coltre di batterî, anche perché le alte e chiare cellule che lo rivestono non potrebbero occultare alcun batterio, che vi fosse contenuto.

Non è invece il caso di pensare che causa dell'invisibilità dei batterî sia la loro piccolezza, come ritiene il PIERANTONI (1931) per l'eterottero *Gonocerus*, dove i batterî dell'animale adulto sono talmente piccoli da non potersi vedere nella migrazione attraverso il follicolo, mentre sono allungati e ben visibili in oociti giovani. Si deve anche escludere che i batterî possano passare, come i simbionti dell' *Oryzaephilus surinamensis* (KOCH 1930, 1931) e quelli di *Lyctus linearis* (KOCH 1936), per spazî intercellulari. Nella *Blattella germanica* le cellule follicolari sono sempre ben aderenti fra loro.

Si può anche fare un'altra ipotesi: che la migrazione avvenga durante la vita embrionale o larvale. Negli embrioni non ho tuttavia trovato alcun segno neppure indiretto di migrazione dei batterî nelle gonadi; e quanto alle larve, non ne ho avuto disponibili per lo studio. Si deve però ricordare che il GIER, che pure sostiene quest'ipotesi per la *Periplaneta americana*, non è riuscito a darne la dimostrazione obiettiva, né nell'embrione, né nei primi stadî larvali.

Non ho mai osservato nelle uova di *Blattella* un movimento retrogrado come quello che secondo il KOCH avviene in *Oryzaephilus surinamensis*, dove i batterî, già penetrati nel vitello, si ritirano nuovamente alla superficie.

2. *L'invasione dell'embrione.*

Bibliografia.

Secondo il BLOCHMANN (1887, 1892) i batterî si trovano alla superficie dell'uovo di Blattella germanica appena deposto; sotto il blastoderma, allorché questo si è formato; penetrano poi nell'interno dell'uovo, dove occupano le zone fluidificate del vitello. Successivamente, mentre l'embrione, che si è formato alla superficie ventrale dell'uovo, va estendendosi dorsalmente, si ritrovano i batterî contenuti in cellule situate nel corpo adiposo. L'autore dice di non essere riuscito a sorprendere lo stadio nel quale i batterî migrano dal vitello al corpo adiposo.

Il WHEELER (1889) osserva i batterî nello strato periferico dell'uovo prima che inizî lo sviluppo, specialmente al centro della superficie dorsale e al polo cefalico, e li vede anche penetrare nel primo globulo polare; non li segue però durante lo sviluppo.

Il CHOLODKOVSKY (1891) che ritiene i batteri contenuti non nelle zone di fluidificazione, ma nel citoplasma delle cellule vitelline, spiega la migrazione ammettendo che il corpo adiposo sia formato da cellule vitelline migrate e che alcune di esse conducano con sé i batteri. HEYMONS (1895), seguíto anche dal BUCHNER (1921) pensa invece che la migrazione sia attiva.

Lo studio piú ampio sul comportamento dei batterî durante lo sviluppo è dovuto al HEYMONS, la cui opera non ho potuto consultare direttamente e che perciò devo citare dal riassunto che ne dà il BUCHNER (1921). Il HEYMONS si occupa di parecchie specie di blattidi. Nella Blattella germanica, secondo le sue ricerche, quando la striscia germinativa comincia a circondare l'uovo, i batteri sono in gran parte addensati nel centro del vitello. Maggiori particolari fornisce per la specie indicata come Periplaneta, che è probabilmente la Blatta orientalis: i batterî, inizialmente raccolti ai poli in due cumuli, pentrano nel vitello e confluiscono, accompagnati da un gruppo di nuclei vitellini; formano cosí una massa centrale di batterî e di nuclei che, per effetto del successivo sviluppo dell'embrione, viene a trovarsi inclusa nell'intestino medio. Allora, mentre le cellule vitelline degenerano, i batterî attraversano l'epitelio intestinale e si raccolgono attorno ad alcuni nuclei del corpo adiposo. Il CHOLODKOVSKY (1891) pure citato dal BUCHNER, avrebbe visto batterî nell'intestino medio di Blattella germanica.

Il HEYMONS descrive anche in Ectobia un cumulo di batterî nel mezzo del

vitello; però il suo disegno, riprodotto nella fig. 40 del BUCHNER, dimostra chiaramente che si tratta di uno stadio precoce, in cui l'embrione è ancora limitato a una striscia ventrale, e l'intestino non è ancora formato.

Un'associazione di batterî e di nuclei vitellini viene pure descritta dal GIER (1936) nella Periplaneta americana: i batterî si raccolgono attorno a nuclei fino da quando sono alla superficie dell'uovo e con essi migrano al centro del vitello dove costituiscono un „micetoma primario", che successivamente si rompe lasciando liberi i batterî che entrano nel corpo adiposo.

Nel lavoro del KOCH (1938) destinato soprattutto al Mastotermes, si trova come appendice, un cenno sul comportamento dei batterî nell'embrione dei blattidi: in Blattella egli osserva batteriociti embrionali, a disposizione segmentale, nella parte mediale dei lobi adiposi, immediatamente confinanti con la lamella entodermica, attraverso la quale i batterî provengono dal vitello.

Quanto al corpo adiposo e alla sua origine embriologica, rimando per la bibliografia completa alla monografia del PARDI (1939) e mi limiterò qui a ricordare ciò che è strettamente necessario per comprendere ciò che segue, e soprattutto le ricerche compiute sulla specie qui trattata.

E ormai dimostrata errata la concezione del CHOLODKOVSKY (1890), per cui il corpo adiposo della Blattella deriverebbe da cellule vitelline immigrate nella cavità del corpo; e neppure è più accettata l'origine entodermica, sostenuta dal WHEELER (1889) o quella ectodermica ammessa fra gli altri dal GRABER (1891). Si ritiene oggi concordemente dagli embriologi che il corpo adiposo derivi, in tutti gli insetti, dal mesoderma, per quanto il suo processo di istogenesi sia, secondo il PARDI, ancora scarsamente noto.

In molti insetti (BERLESE 1901, PARDI 1939) si distingue, nel corpo adiposo, una porzione distale o esterna o parietale, aderente alla membrana basale dell'ipoderma, e una prossimale o interna o viscerale che riveste i visceri e in particolare il tubo intestinale. Secondo il BERLESE (1909) le due porzioni derivano da parti diverse della parete ventrale o somatica del sacco celomico: il grasso prossimale o viscerale dalla parte più mediale, dove le cellule mesodermiche perdono il loro nesso primitivo, entrano nel sacco celomico e ne causano l'apertura della parete; invece il grasso distale o parietale si forma nella parte più laterale e si sviluppa fuori della membrana peritoneale. TIEGS e MURRAY (1938) trovano che il corpo adiposo viscerale, nella Calandra oryzae, deriva dalla parete inferiore dei sacchetti celomici, mentre il corpo grasso parietale origina dalle cellule della parete esterna dei sacchetti celomici, che non si sono trasformati in muscoli.

E' bene ricordare che il corpo adiposo non contiene solamente grasso, ma anche concrezioni di urato di sodio (CUENOT 1896), che per quel che riguarda la Blattela germanica, possono comparire già negli stadî embrionali (PATTEN 1884, WHEELER 1889). Normalmente le cellule contenenti urati sono distinte dalle adipose e dai batteriociti, ma secondo HOLLANDE (1931) nella Blatta orientalis qualche concrezione urica può trovarsi anche nelle cellule adipose e perfino nel corpo dei batterî. Il corpo adiposo contiene inoltre globuli proteici (BERLESE).

Reperti personali.

Stadio dei batterî superficiali.

Nello stadio di blastoderma e durante la formazione della stria germinativa, i batterî rimangono alla superficie dell'uovo: non sono più uniformemente disposti come nell-uovo ovarico, né concentrati ai poli, ma riuniti in gruppetti disseminati irregolarmente. Si trovano anche sotto l'embrione; ma ciò è dovuto semplicemente al fatto che si trovano sotto tutto il blastoderma, e perciò anche nella parte che si trasforma in embrione: non si tratta ancora di una migrazione verso l'embrione.

La situazione superficiale dei batterî permane durante la formazione del mesoderma, che compare in forma di placca, e si trasforma poi in sacchetti cavi segmentali, e mentre si abbozzano le appendici. Il vitello, come nell'uovo ovarico, contiene gocce adipose che sciolte dai reattivi appaiono come spazî vuoti; per il resto è in parte omogeneo, in parte schiumoso e granuloso, ad eccezione di uno strato superficiale sottilissimo, sottostante al blastoderma e all'embrione, strato che contiene i batterî.

Stadio di cumulo centrale.

I batterî entrano nell'interno del vitello nello stadio in cui si abbozzano le ultime appendici addominali. Le dette appendici sono formate da uno o due strati di cellule ectodermiche, e dal mesoderma, che ha già perduto la forma di sacchetto, perché, mentre la lamina splancnica è ancora riconoscibile, la lamina somatica si è dissociata nelle sue cellule che hanno riempito la cavità del somita. E' comparso il seno epineurale, rappresentato da uno spazio fra il vitello e l'embrione, contenente una sostanza omogenea che è evidentemente (WHEELER, BERLESE) un liquido coagulato, e che formerà, per un lungo periodo dello sviluppo embrionale, il contenuto della cavità del corpo. Si riconoscono nell'ectoderma le cellule iniziali del sistema nervoso, sferiche e grosse, con scarso protoplasma e nucleo vescicoloso.

In questo stadio esistono ancora batterî alla superficie, ma la maggior parte è già migrata nell'interno del vitello, dove costituisce un unico cumulo di forma irregolare, situato negli spazî fra le grosse zolle, press'a poco nel centro dell'uovo, all'altezza dei primi segmenti addominali.

In prossimità ai batterî, sia superficiali, sia centrali, può trovarsi un nucleo vitellino (fig. 3), non mai però cosí vicino da far dedurre che i batterî siano nel citoplasma, ancorché non riconoscibile, che lo circonda. Non vi è dunque, in questa specie, alcunché di simile ai „micetociti primarî" visti dal GIER nella *Periplaneta americana*, e neppure l'associazione fra batterî e nuclei, descritta dal HEYMONS nei blattidi da lui studiati. Nella *Blattella germanica* i batterî sono sicuramente liberi nel vitello e la vicinanza di qualche nucleo appare casuale.

Comparsa delle cellule vescicolose.

Nel progresso dello sviluppo i batterî si concentrano tutti nel cumulo centrale, e non se ne trovano piú né alla superficie né lungo il percorso. Il cumulo centrale non è ben circoscritto, ha forma estremamente variabile e può essere suddiviso in parecchie parti, sempre però vicine e confluenti.

In tale stadio (fig. 4), i somiti mesodermici sono divenuti masse irregolari di cellule fra le quali si è estesa la sostanza omogenea che è comparsa per la prima volta nel seno epineurale. Numerose cellule mesodermiche dei segmenti addominali e alcune dei segmenti toracici si sono trasformate in cellule vescicolose, che sembrano doversi interpretare, come dimostra la successiva evoluzione, quali costituenti il primo abbozzo del corpo adiposo. Si noti però che in questo stadio non sono mai riuscito a dimostrare in esse, coi metodi specifici, un contenuto adiposo, mentre nelle stesse sezioni si colorano senza difficoltà le gocce adipose del vitello. Mi sono venuti a mancare, dopo aver fatto questa osservazione, gli stadî embrionali necessarî per studiare sistematicamente il comportamento dei grassi nel successivo sviluppo dell'embrione e per stabilire esattamente il momento della loro comparsa. E' comunque evidente che l'aspetto vescicoloso delle cellule nei comuni preparati non implica senz'altro la natura di adipose; preferirò perciò indicare le cellule e le formazioni in cui sono contenute col nome di „vescicolose".

L'entoderma è già riconoscibile, ed è formato, nelle sezioni trasversali, da due strisce laterali, per lo piú distinte e solo in alcuni tratti confluenti sulla linea mediana: esso separa il vitello, con cavità e zolle a struttura schiumosa e granulare, dal seno epineurale contenente sostanza omogenea.

I

Fig. 1.

Fig. 2.

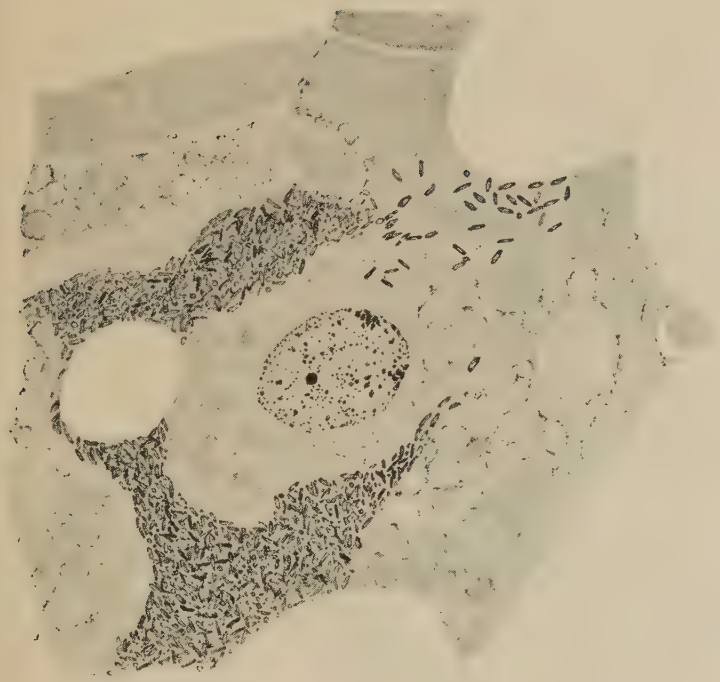


Fig. 3.

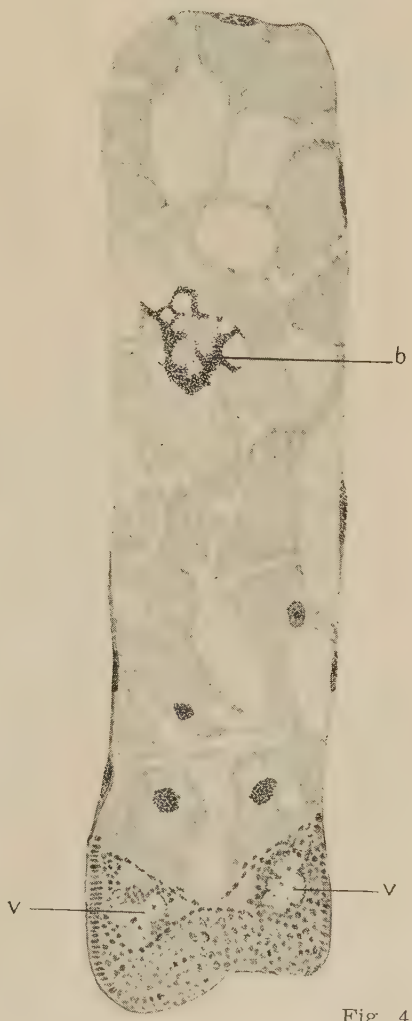


Fig. 4.

E. Borghese del.

Fig. 5.

Fig. 6.

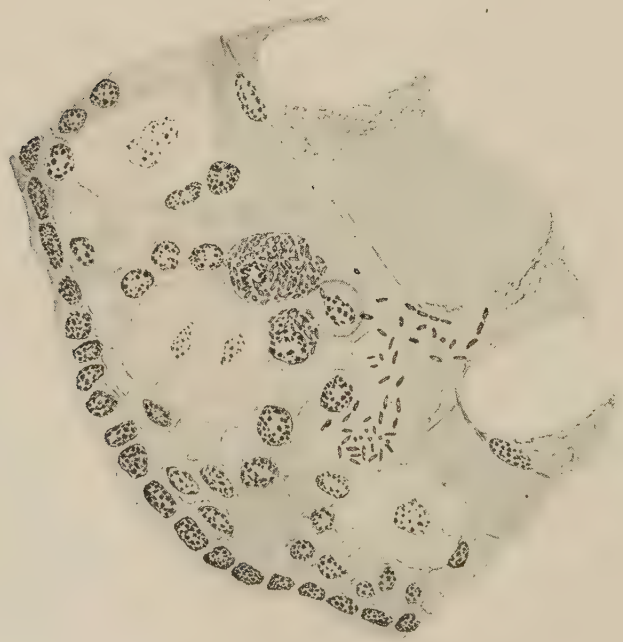


Fig. 7.

E. Borghese del.

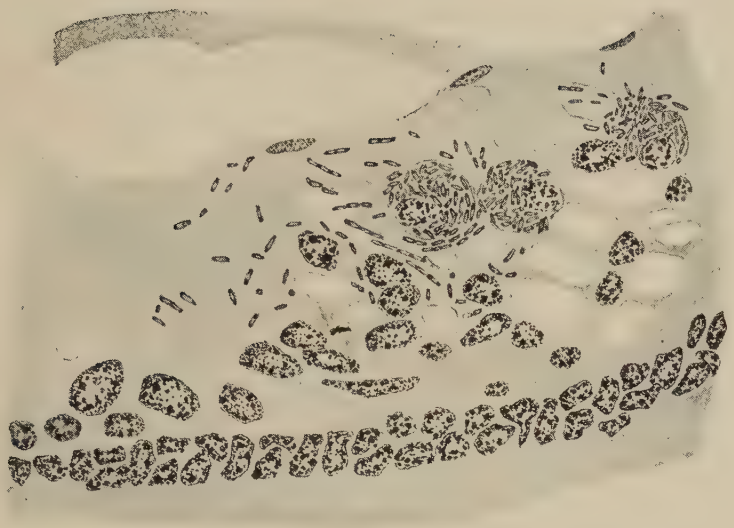


Fig. 8.

Fig. 9.

In uno stadio un po' piú progredito, oltre i batterî centrali, si possono trovare alcuni batterî anche in altre parti dell'uovo, distanti dal cumulo centrale e senza continuità con questo: se ne vedono presso l'entoderma, e anche oltre di esso, nel seno epineurale: qualche gruppetto è sotto il corpo sottoesofageo e in vicinanza del ganglio sottoesofageo. Non se ne trovano nello strato superficiale dell'uovo, e non sono ancora comparsi i batteriociti.

Il comportamento successivo fa ritenere che i batterî che si trovano distaccati dal cumulo centrale e vicini all'embrione, non siano batterî ritardatarî della migrazione già compiuta dalla superficie al centro, ma indichino la via che compiono nella nuova migrazione dal cumulo centrale verso l'embrione.

Si ricordi però che il vitello è fluido o semifluido, come si osserva esaminando l'uovo a fresco: ed è pure, molto probabilmente, liquida la sostanza omogenea del seno epineurale e degli altri interstizî dell'embrione. Non si può dunque escludere che i batterî siano trasportati dalle correnti fluide che si formano al momento della fissazione e che si trovino in luoghi diversi da quelli dove erano effettivamente nel vivo. Questo dubbio può valere per i piccoli gruppi di batterî che si trovano disseminati nei luoghi sopra elencati; si deve invece escludere per il cumulo centrale di batterî, la cui posizione è assolutamente fissa e costante in molti embrioni esaminati e si mantiene a lungo per un periodo di sviluppo di parecchi giorni.

Stadio di migrazione dei batterî nell'embrione.

I batterî escono dal vitello e invadono alcune cellule del mesoderma, che diventano batteriociti, quando l'uovo è nello stadio rappresentato dalla fig. 5. L'embrione occupa ancora una piccola parte dell'uovo: le appendici toraciche sono ripiegate ma non ancora articolate e le addominali non hanno iniziato la regressione; i ganglii nervosi sono ben distinti; lo stomodeo e il proctodeo sono ben riconoscibili, ma ancora molto brevi. L'entoderma delimita il vitello dall'embrione e si riconosce, nelle sezioni trasversali (fig. 6) come una lamina, qua e là discontinua, di cellule a nucleo sferico e protoplasma sottilissimo: le sezioni longitudinali dimostrano che le porzioni provenienti dagli abbozzi craniale e caudale non si sono ancora incontrate. Il seno epineurale si è ampliato verso i lati.

Il vitello ha conservato i caratteri degli stadî precedenti: presenta spazî vuoti, trabecole reticolate, schiumose o granulari; i nuclei sono divenuti giganti e la loro cromatina è molto frammentata, segno probabile di degenerazione.

Il mesoderma, escluse le cellule che si sono trasformate in mioblasti, cardioblasti e cellule genitali, è divenuto una formazione reticolare a contorni ancora indecisi, che rappresenta l'abbozzo del corpo adiposo e occupa quasi tutto lo spazio fra ectoderma ed entoderma, divenuto ormai vera cavità del corpo, in continuità col seno epineurale e ripieno della sostanza omogenea di cui si è parlato.

Oltre i batteriociti, di cui parleremo fra poco, si trovano nel mesoderma due tipi di cellule: alcune sono vescicolose, in piccolo numero, con nucleo piccolo, chiaro, poliedrico, e citoplasma ridotto a sottilissime trabecole fra le vescicole. Queste cellule non sono mai in cariocinesi. Di tutte le altre sono ben riconoscibili i nuclei, talvolta in divisione, ai punti nodali

di un reticolato, a contorni estremamente indefiniti, che evidentemente rappresenta il loro citoplasma.

Chiamerò d'ora in avanti queste formazioni „lobi vescicolosi"; lo sviluppo successivo dimostra che essi sono gli abbozzi del corpo adiposo, sebbene non abbia potuto accertarmi se in questo stadio il grasso sia già presente.

Dalle sezioni longitudinali si vede che i lobi vescicolosi sono metamerici; dalle trasversali, che sono bilaterali e simmetrici, e che non raggiungono la linea mediana, ma si arrestano ai margini dei ganglii. Ogni metamero è costituito da una parte ventrale con numerose cellule vescicolose, che darà origine al lobo adiposo viscerale; e da una dorsale, con minor numero di cellule vescicolose, destinata a produrre il lobo adiposo parietale dorsale. Le due porzioni non sono ben distinte nel torace; nell'addome sono separate dall'abbozzo della gonade.

In questo stadio si può sorprendere (figg. 7, 8) la migrazione dei batterî nei lobi vescicolosi. I batterî non si trovano piú nel centro del vitello, ma sono alcuni in procinto di attraversare l'entoderma, pare attraverso gli spazî fra le cellule, altri sono giunti nel seno epineurale, oppure sono già entrati nei lobi vescicolosi.

I batteriociti, il cui contorno è per lo piú irregolare, in questo stadio, ma sempre ben definito, cosí da sembrare provveduti di membrana, sono quasi tutti situati nella parte mediale dei lobi vescicolosi ventrali, rivolta verso il seno epineurale. Il loro nucleo, regolarmente sferico, assomiglia a quello delle altre cellule non vescicolose; può essere talvolta un po' piú grande. La maggior parte dei batteriociti sono completamente formati, hanno contorni riconoscibili e citoplasma completamente infarcito di batterî. Entro i lobi vescicolosi non si trovano batterî estracellulari: qualche raro gruppetto di batterî nelle vicinanze di un batteriocito la cui membrana appare interrotta, è evidentemente uscito per rottura avvenuta durante i trattamenti tecnici.

In tutti gli esemplari di questo stadio si osservano immagini che credo si possano interpretare come lo stadio già ricercato invano dal BLOCHMANN e neppure ritrovato dagli autori successivi: lo stadio cioè in cui i batterî, attraversato l'entoderma e giunti nella cavità del corpo, penetrano nel citoplasma di cellule mesodermiche, che per ciò diventano batteriociti.

Nella sostanza omogenea che riempie il seno epineurale si vedono piccoli gruppi di batterî, specialmente verso la linea mediana: piú lateralmente i lobi adiposi sono a immediato contatto con l'entoderma e ivi i batteriociti sono già formati. Batterî isolati si trovano pure nella parte di cavità del corpo, piuttosto larga, situata all'estremità caudale, attorno al proctodeo.

Abbiamo considerato come protoplasma delle cellule non vescicolose del mesoderma la parte del reticolo che sta attorno ai nuclei. Raramente si riesce a distinguere un citoplasma ben circoscritto. I batterî si vedono raggruppati attorno ai nuclei, cosí che sembra che da un sincizio vadano distaccandosi e individuandosi cellule ben distinte. Un'interpretazione simile non dovrebbe meravigliare trattandosi di insetti, per i quali è stato affermato che i nuclei vitellini sono da principio nudi e poi raccolgono attorno a sé il citoplasma: ma mi pare piú verosimile, richiamandosi al comune concetto dell'indissolubilità di nucleo e citoplasma, supporre che i contorni citoplasmatici siano fino a questo momento difficilmente riconoscibili per ragioni di tecnica.

Non manca anche, sebbene non frequente, il reperto di cellule ora piccole ora grandi, con citoplasma visibile, omogeneo, occupato da pochi batterî: evidentemente è lo stadio iniziale di formazione dei batteriociti.

Verso i nuclei apparentemente nudi o verso queste ultime cellule si dirigono catene di batterî, raggruppati a formare piccoli sciami, cosí frequenti in molte sezioni e in tutti gli individui di questo stadio, da potersi ritenere che questo sia un reperto non accidentale e tanto meno dovuto alla fissazione. La disposizione a catene, evidentemente dovuta a moltiplicazione in atto, esclude che si tratti di batterî usciti accidentalmente dalle cellule. Catene di una certa lunghezza non si trovano mai nelle cellule, dove lo spazio disponibile è troppo angusto, né nel vitello.

Non si trovano batterî nelle cellule vescicolose. E' evidente che i batteriociti derivano da alcune cellule mesodermiche che non hanno subíto la trasformazione in vescicolose, e che fino a questo punto non si possono distinguere dalle altre. Non esistono nei blattidi „micetomi" già abbozzati prima che vi entrino i simbionti, come si è osservato in altri insetti; per citare un solo esempio, nell' *Oryzaephilus surinamensis* (PIERANTONI 1930, KOCH 1930, 1931).

Non ho elementi per giudicare se la migrazione dal vitello all'embrione sia attiva come vorrebbe il BUCHNER e passiva come ritiene il GIER. Certamente i batterî non vengono trasportati da cellule, come pensava il CHOLODKOVSKY e come per altre simbiosi è stato dimostrato: nel *Lyctus linearis* infatti il KOCH ha dimostrato il trasporto dei simbionti ad opera degli amebociti.

Quanto al passaggio attraverso l' entoderma, la sottigliezza estrema di questo foglietto non esclude che possano anche attraversarne le cellule senza che ciò sia dimostrabile nelle sezioni; però le cellule entodermiche non costituiscono una lamina continua, ma presentano qua e là lacune dove si possono vedere i batterî; si tratta comunque di lacune disposte irregolarmente in una lamina qua e là fenestrata e non di aperture regolari come l'„apertura mediana" e la „fessura trasversale" indicati dal KOCH nel *Lyctus linearis*.

I batteriociti mancano nel torace in questo stadio e in tutti i successivi. Nell'addome non si trovano nei lobi dorsali e sono contenuti in tutti i lobi ventrali, eccetto che in quelli all'estremità caudale.

Stadî successivi alla migrazione dei batterî.

Nel primo stadio successivo a quello ora descritto, l'embrione si è esteso lungo i fianchi e ha raggiunto il contorno dorsale, dove si è formato il vaso dorsale o cuore, ripieno di sostanza omogenea simile a quella contenuta nel celoma. La lamina entodermica, che era aperta nelle sezioni trasversali dei precedenti stadî, si è chiusa, formando cosí l'intestino medio, il cui lume è completamente occupato da vitello.

Da questo momento non si trovano piú batterî nel vitello. L'assenza di batterî è stata confermata su parecchi esemplari di questo stadio e di tutti i successivi; si deve perciò concludere che nella *Blattella germanica,* quando l'intestino è formato, i batterî sono già usciti dal vitello, al contrario di quento ha descritto il HEYMONS per la *Blatta orientalis*.

Il tessuto vescicoloso, occupando tutto lo spazio fra ectoderma ed entoderma, costituisce ora un anello quasi completo, interrotto solo dalla presenza del cuore dorsalmente e della catena nervosa ventralmente. Ha

sempre aspetto reticolare, senza contorni ben definiti; può contenere sostanza omogenea nelle maglie; vi sono disseminate cellule alveolari. Nel torace, dove non contiene mai batteriociti, si può, in alcune sezioni, distinguere la parte ventrale dalla dorsale. Nell'addome tale divisione è piú netta per l'interposizione della gonade; i batteriociti si trovano solo nella parte ventrale: sono sferici, con membrana cellulare ben riconoscibile, e sono situati sul lato mediale dei lobi vescicolosi, dove si trovano a immediato contatto con l'entoderma, e sembra talvolta che, ricoperti da questo, facciano sporgenza nel vitello. In sezioni longitudinali i batteriociti costituiscono lamine metameriche in ciascuna delle quali sono accostati come le piastrelle di un pavimento.

Un po' piú tardi, quando l'embrione è piú progredito nello sviluppo ma l'intestino medio occupa ancora gran parte della sezione trasversale, i batteriociti non sono piú situati alla superficie mediale dei lobi vescicolosi, ma sono penetrati nell'interno di essi. La forma perfettamente sferica dei batteriociti farebbe escludere la possibilità di una migrazione attiva, e fa presumere che essi siano stati inglobati dall'accrescimento delle altre cellule.

Oltre ai due lobi vescicolosi ventrale e dorsale finora descritti, che daranno origine rispettivamente al lobo viscerale e al lobo parietale dorsale, si osserva ora per la prima volta un nuovo lobo parietale, situato in avanti, fra la catena nervosa e l'ectoderma: in alcune sezioni appare in continuità col lobo viscerale, in altre ne sembra distaccato per l'interposizione di un muscolo ventrale. Quanto alla sua origine, sembra si tratti di una porzione del lobo viscerale che se ne separa parzialmente: comunque si distingue nettamente da quest'ultimo per la mancanza, ora e in tutti gli stadî successivi, di batteriociti.

Progredendo lo sviluppo, il diametro della sezione trasversale dell'intestino, che è sempre pieno di vitello, diminuisce sempre piú, mentre la cavità del corpo si ingrandisce: la sostanza omogenea non la occupa piú interamente, ma si riduce ai contorni dell'intestino medio e dei ganglii, al confine fra i lobi vescicolosi dorsali e i ventrali e attorno al proctodeo; il resto è completamente vuoto. Lo stomodeo e il proctodeo, nei quali ormai si distinguono bene i due strati ectodermico e mesodermico, cominciano a introflettersi al punto di passaggio all'intestino medio; si abbozzano le trachee, e nelle zampe compaiono le articolazioni.

In questo stadio i lobi vescicolosi viscerali, simmetrici e ancora metamerici, giungono medialmente fino ai margini della catena nervosa: hanno ormai acquistato contorni ben definiti e contengono scarse tracce di sostanza omogenea; sono costituiti da un reticolato a larghe maglie, dall'aspetto simile a quello del tessuto adiposo dei vertebrati, con nuclei nei punti nodali e maglie occupate da grande quantità di grasso, che a questa età ho potuto riconoscere sicuramente col Sudan. Alcune cellule hanno conservato i loro contorni, per quanto completamente vacuolate; hanno nucleo piccolo, stellato e retratto. Vi è un gruppo di batteriociti per ciascun metamero addominale.

I lobi vescicolosi parietali, dorsale e ventrale, perdurano in uno stadio piú arretrato di quelli viscerali: non hanno contorni ben decisi; la loro struttura reticolare è piú larga e a maglie piú semplici e piú grosse; mancano le cellule alveolate; contengono resti piú abbondanti di sostanza omogenea. Non contengono batteriociti.

In uno stadio ancora piú progredito, lo stomodeo è dilatato e l'intestino medio si è ristretto, lasciando, fra sé e il cordone nervoso, un ampio spazio occupato in gran parte da tessuto vescicoloso; si tratta dei lobi adiposi viscerali dei due lati, che cominciano a diventare asimmetrici e apparentemente confluenti, essendo talvolta la linea di separazione difficilmente riconoscibile. I batteriociti, in alcune sezioni, sono ancora allineati in file dorso-ventrali, in altre sono disposti a cumuli irregolari. Le sezioni longitudinali dimostrano che la disposizione segmentale dei lobi adiposi va perdendosi e si forma un'unica fascia di tessuto vescicoloso, nella quale però i batteriociti conservano la disposizione a gruppi.

I lobi parietali dorsali non si sono modificati. I lobi parietali ventrali si sono maggiormente sviluppati: in alcune sezioni sono simmetrici e laterali, in altre appaiono come un corpo unico, situato sulla linea mediana ventrale, davanti al cordone nervoso.

Nelle sezioni addominali di embrioni in uno stadio molto vicino alla schiusa (fig. 9) (arti ben sviluppati, occhi pigmentati, visceri ben costituiti, con scarsissima quantità di residui di vitello nell'intestino medio, cavità del corpo ben formata e senza piú tracce di sostanza omogenea), i lobi adiposi dorsali non hanno modificato la loro posizione, mentre i lobi adiposi viscerali occupano un largo spazio fra la sezione dell'intestino e il cordone nervoso. In alcune sezioni si possono distinguere quelli dei due lati, ma la linea di separazione non è mediana, e risultano perciò asimmetrici. I lobi viscerali hanno contorni irregolari, e si insinuano anche in mezzo ai muscoli; in qualche parte pare si continuino coi parietali dorsali.

Nel mezzo di ciascun lobo viscerale vi è un gruppo di batteriociti; raramente se ne trova piú di un gruppo. Il resto del lobo viscerale è tutto vescicoloso e contiene alcune cellule con citoplasma alveolare ben riconoscibile, mentre le altre formano un reticolato difficilmente analizzabile.

Sotto l'ipoderma ventrale, fra questo e i muscoli, vi è il lobo parietale ventrale che, nella sezione riprodotta nella figura, è asimmetrico e in continuità con un lobo viscerale. Non contiene mai batteriociti.

Le gonadi sembrano incuneate nei corpi adiposi; sempre però separate da una linea di distinzione netta. Il Sudan dimostra in questi stadî la presenza di abbondante grasso in tutti i lobi.

Larva neonata.

Al momento della schiusa l'embrione subisce un brusco cambiamento di forma: finora compresso lateralmente, ora si appiattisce in senso dorsoventrale e le facce laterali si trasformano in margini sottili.

I lobi adiposi viscerali si spostano lungo i margini dove occupano il piccolo interstizio triangolare che rimane a fianco dei visceri. In ogni sezione trasversale sono rappresentati da due a tre lobetti, situati fra l'intestino medialmente, la gonade indietro, il ganglio ventralmente. Il rapporto con la gonade è molto stretto e ivi i batteriociti, invece di essere avvolti da cellule vescicolose, possono trovarsi alla periferia e perciò a diretto contatto con la gonade, senza però penetrarvi.

Nell'addome, al centro di ogni lobo si trova un gruppo di batteriociti. Le sezioni longitudinali mostrano che i lobi sono molti e distinti, sebbene non si possano piú mettere in rapporto con la metameria del corpo. I lobi parietali dorsale e ventrale sono ridotti a laminette molto sottili.

La quantità di tessuto adiposo alla nascita è molto scarsa, essendo la cavità del corpo occupata quasi esclusivamente dai visceri.

La moltiplicazione dei batteriociti.

Si moltiplicano i batteriociti? Il BLOCHMANN si era già domandato se dal momento in cui si formano, essi aumentino per migrazione di batterî in cellule nuove o per divisione di esse; non potè provare né l'una né l'altra ipotesi, ma le ritenne entrambe possibili. Gli autori successivi hanno sempre cercato invano mitosi dei batteriociti in blatte normali; esse però possono comparire in una condizione patologica, e precisamente nell'infezione da un microsporidio del genere Plistophora (MERCIER 1908): allora i batteriociti perdono i batterî, e poi si dividono per mitosi.

In generale si ritiene che i batteriociti si moltiplichino, ma solo per amitosi. Così pensa il MERCIER (1906, 1907), che per altro rappresenta nel suo disegno (1907), non l'amitosi in atto, ma una cellula con due nuclei. Anche per il Mastotermes darwiniensis, i cui batterî sono simili a quelli delle blatte, il JUCCI presume la divisione amitotica; e nella stessa specie il KOCH interpreta come figure amitotiche nuclei allungati, pur ammettendo di non avere mai visto in atto la separazione. Effettivamente la sua figura rappresenta due nuclei vicini e un nucleo allungato, ma non una vera figura di amitosi.

Al contrario il GIER nega, in Periplaneta americana, non solo l'esistenza di alcuna forma di divisione dei batteriociti, ma afferma che il loro numero non aumenta dopo la prima infezione.

In tutte le mie ricerche, che riguardano l'adulto e tutti gli stadî della vita embrionale, non sono mai riuscito a dimostrare la moltiplicazione dei batteriociti né per mitosi né per amitosi, pur avendo esaminato sistematicamente tutte le sezioni. Sono invece frequenti i casi di batteriociti con due nuclei, sia nell'embrione sia nell'adulto; non ho mai trovato nuclei a biscotto che facessero sicuramente pensare a fatti di amitosi.

I batteriociti compaiono fin dall'inizio molto numerosi: ma sarebbe molto difficile concludere da ciò, come ritiene il GIER per la specie da lui studiata, che non si moltiplichino più: né d'altra parte ho mai trovato alcun reperto che faccia supporre la migrazione dei batterî da una cellula all'altra nell'interno del corpo adiposo. Rimane da spiegare la presenza nella stessa cellula di due nuclei, che non potrebbero avere altra origine che da una divisione. Ma bisogna riconoscere che non si è ancora riusciti a provare l'esistenza di tali divisioni, perché, come si è visto sopra, anche gli autori che l'affermano la deducono da dati indiretti, ma non l'hanno sicuramente riconosciuta.

Conclusioni.

I batterî simbionti della *Blattella germanica* vivono in cellule situate al centro dei lobi adiposi: i „micetociti" o „batteriociti", di cui occupano interamente il citoplasma. Pare che i batterî, fuori del periodo della riproduzione, abbiano vita esclusivamente endocellulare perché non se ne trovano liberi, neppure nell'ambito dei corpi adiposi, tranne che nel caso di rottura della cellula, presumibilmente dovuta alla tecnica.

I batterî escono dalle cellule al momento della riproduzione. Usciti dai batteriociti, per un processo non ancora completamente noto (forse previa migrazione dei batteriociti stessi dai lobi adiposi al tessuto periovarico), e trovatisi liberi nello spazio ricco di trachee che circonda gli ovarioli, attraversano, in un punto che non si è ancora definito, la parete del follicolo e giungono sugli oociti all'inizio del loro accrescimento.

Si moltiplicano allora sulla superficie degli oociti, in modo da costituire un tappeto uniforme, prima semplice poi stratificato; e quando l'uovo inizia il suo accrescimento in lunghezza che lo rende da sferico, allungato e quasi cilindroide, la loro riproduzione non è più sufficiente a mantenere continuo lo strato, che perciò si dirada, specialmente sui fianchi, mentre

i batterî rimangono piú addensati ai poli, senza per altro costituire veri cumuli.

Intanto i batterî sono passati dall'esterno all'interno dell'uovo, e hanno occupato un sottile strato periferico di citoplasma, che si ritiene non contenere vitello.

Deposto l'uovo nell'ooteca, e iniziatosi il suo sviluppo, mentre dal blastoderma ventrale va formandosi la striscia embrionale, i batterî abbandonano la superficie e confluiscono nel centro del vitello, in un cumulo al quale non partecipano nuclei vitellini.

In un successivo momento della vita embrionale, quando si va abbozzando dal mesoderma il corpo adiposo, il cumulo centrale si disfà e i batterî, riattraversato il vitello, giungono a contatto con la parte addominale dell'entoderma, lo oltrepassano, entrano nel seno epineurale e aggrediscono le cellule piú vicine del mesoderma, che riempiono rapidamente, trasformandole in batteriociti.

I batteriociti, la cui moltiplicazione è presunta ma non sicuramente dimostrata, presto occupano il centro dei lobuli adiposi viscerali, che da principio metamerici, vanno poi riunendosi in senso longitudinale e finalmente si frammentano in numerosi lobetti che al momento della nascita rivestono i fianchi dell'addome e ciascuno dei quali contiene nel centro un gruppetto di batteriociti contigui.

Le ricerche sui batterî hanno reso necessario lo studio dello sviluppo del corpo adiposo, e hanno condotto a modificare, almeno per questa specie, le nostre conoscenze sull'argomento, del resto non molto numerose e che si riducono, per quanto so, principalmente alle ricerche, su altri gruppi di insetti, di BERLESE e di TIEGS e MURRAY.

La prima comparsa del corpo adiposo è costituita da un abbozzo unico, derivato dalla parte del mesoderma che non ha dato le gonadi, il cuore e i mioblasti e che forma prima una lamina e poi un tubo quasi completo fra l'entoderma e l'ectoderma. Poco tempo dopo la sua comparsa, il corpo adiposo si distingue in una porzione dorsale e una ventrale. La parte dorsale aderisce subito all'ectoderma e acquista la posizione che conserverà per sempre: essa produrrà i lobi adiposi parietali dorsali, privi di batteriociti, che anche nell'adulto costituiscono lamine sottili, un po' trasparenti, situate sotto la cute del dorso, ai lati del cuore.

Dalla parte ventrale, in cui entrano i batteriociti, derivano i lobi adiposi viscerali, che aumentano notevolmente di volume durante la vita embrionale e che già nell'embrione perdono la metameria e la simmetria bilaterale per formare i lobi che circondano piú o meno irregolarmente i visceri e che al momento della nascita occupano le parti laterali della cavità addominale.

In uno stadio embrionale un po' piú tardivo, dai lobi viscerali si separano parzialmente parti prive di batteriociti, che prendono un rapporto con la cute molto simile a quello dei lobi dorsali. Si tratta dei lobi parietali ventrali, che differiscono da quelli dorsali anche per la mancanza di simmetria, perché compaiono, anche nello stesso embrione, su sezioni diverse, ora come lobi bilaterali, ora come un solo lobo mediano. Si ritrovano nell'adulto come piccole formazioni adipose che ricoprono ventralmente, in modo irregolare e non simmetrico, il cordone nervoso.

Résumé.

L'Auteur a étudié le cycle de la bactérie symbiote de *Blattella germanica* (L.) au cours de sa transmission éréditaire. Dans la fase de migration ovarienne, les bactéries font issue des bactériocytes de la femelle et franchissent, en un point encore mal connu, la paroi des tubes ovariens pour constituer une couche superficielle autour de l'oeuf.

Au cours de la phase embryonnaire les bactéries convergent tout d'abord au centre du vitellus; puis lorsque à partir du mésoderme prennent naissance les lobes adipeux, les bactéries émigrent vers l'embryon, traversent l'entoderme et le sinus épineural et pénétrant dans le cytoplasme de diverses cellules mésodermiques transforment celles-ci en bactériocytes.

Spiegazione delle figure.

Fig. 1. — Particolare di ovario di Blattella germanica adulta. Un uovo sferico, contenuto in un follicolo sottile (f_1), con tappeto semplice di batterî (**b**) alla superficie. A sinistra una piccola porzione di un uovo piú grande, dello stesso ovariolo; il follicolo (f_2) è piú spesso e i batteri (**b**) sono entrati nel citoplasma. Fiss. Petrunkewitsch, color. ematossilina ferrica di Heidenhain. Spessore 6 micron. Ingr. 750 ×.

Fig. 2. — Particolare della parete di un follicolo (**f**) in sviluppo avanzato, circondato da batterî che sembrano in procinto di attraversarlo. Batterî periovularî (**b**) alla superficie dell'uovo (**o**). Petrunk., emat. Heiden. Spessore 6 micron. Ingr. 1000 ×.

Fig. 3. — Cumulo di batterî nel centro del vitello e un nucleo vitellino. Fiss. Ciaccio, emat. Heiden. Spessore 6 micron. Ingr. 1000 ×.

Fig. 4. — Stadio della prima comparsa di cellule vescicolose (**v**, **v**) nel mesoderma. Cumulo di batterî (**b**) nel centro del vitello. Ciaccio, emat. Heiden. Spessore 6 micron. Ingr. 140 ×.

Fig. 5. — Preparato in toto di uovo nello stadio di migrazione dei batterî dal vitello all'embrione. Ingr. 44 ×.

Fig. 6. — Stadio di migrazione dei batterî nell'embrione. Sezione trasversale dell'addome. Lobi vescicolosi in corso di formazione: dorsali (**ld**) senza batteriociti, ventrali con batteriociti (**bc**); nel mezzo la gonade (**g**). Batterî (**b**) liberi nel seno epineurale. Entoderma (**e**) e cordone nervoso (**n**). Petrunk., emat. Heiden. Spessore 6 micron. Ingr. 265 ×.

Figg. 7 e 8. — Dallo stesso embrione della figura precedente, a piú forte ingrandimento: batterî sciamanti verso le cellule mesodermiche e batteriociti in corso di formazione. Ingr. 1000 ×.

Fig. 9. — Stadio prossimo alla schiusa. Batteriociti (**bc**, **bc**) nei lobi adiposi viscerali. Lobi adiposi dorsali (**ld**) simmetrici, ai lati del cuore (**c**). Lobo parietale ventrale, asimmetrico (**lv**), senza batteriociti. Ganglio nervoso (**n**). Petrunk., emat. Heiden. Spessore 6 micron. Ingr. 195 ×.

Bibliografia.

BERLESE A., Osservazioni sui fenomeni che avvengono durante la ninfosi degli insetti metabolici. Parte I. Tessuto adiposo (trofociti). Memoria II. Riv. pat. veg. **9**, 1901, 177—344.

BERLESE A., Gli Insetti. Vol. I. Milano 1909.

BLOCHMANN F., Ueber die Richtungskörper bei Insekteneiern. Morph. Jahrb., **12**, 1887, 544—574.

BLOCHMANN F., Ueber das regelmässige Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. Z. f. Biol. **24**, 1887, 1—15.

BLOCHMANN F., Ueber das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **11**, 1892, 234—240.

BUCHNER P., Studien an intracellularen Symbionten. 1. Die intracellularen Symbionten der Hemipteren. Arch. f. Protistenk. **26**, 1912, 1—116.
BUCHNER P., Tier und Pflanze in intrazellularer Symbiose. Berlin 1921. (Esiste una seconda edizione del 1930, che non ho potuto consultare).
BUCHNER P., Ergebnisse der Symbioseforschung. I. Teil. Die Uebertragungseinrichtungen, Erg. Biol. **4**, 1928, 1—129.
CHOLODKOVSKY N., Ueber die Bildung des Entoderms bei Blatta germanica. (Vorläufige Mitteilung). Zool. Anz. **11**, 1888, 163—166.
CHOLODKOVSKY N., Studien zur Entwicklungsgeschichte der Insekten (Blatta germanica). Z. f. wiss. Zool. **48**, 1889.
CHOLODKOVSKY N., Zur Embryologie von Blatta germanica. Zool. Anz. **13**, 1890, 137—138.
CHOLODKOVSKY N., Zur Embryologie der Hausschabe (Blatta germanica). VIII. Kongress russischer Naturforscher etc. in St. Petersburg. Biol. Centralbl. **10**, 1890, 425.
CHOLODKOVSKY N., Die Entwicklung von Phyllodromia germanica. Mém. Acad. Sc. St. Pétersbourg, **38**, 1891. Cit. da Buchner 1921.
CUENOT L., Etudes physiologiques sur les Orthoptères. Arch. de Biol. **14**, 1896, 293—341.
DAWYDOFF C., Traité d'embryologie comparée des invertébrés. Paris 1928.
FORBES, Bacteria normal to digestive organs of Hemiptera. Bull, Illinois State Lab. Nat. Hist. Art. 1, **4**, 1892. Cit. da Mercier 1907.
FRÆNKEL H., Die Symbionten der Blattiden im Fettgewebe und Ei, insbesondere von Periplaneta orientalis. Diss. München, 1918. Cit. da Buchner 1921.
FRÆNKEL H., Die Symbionten der Blattiden im Fettgewebe und Ei, insbesondere von Periplaneta orientalis. Z. f. wiss. Zool. **119**, 1921, 53. Cit. da Gier.
GIER, H. T., The morphology and behavior of the intracellular bacteroids of roaches. Biol. Bull. **71**, 1936, 433—452.
GLASER R. W., Biol. Bull. **39**, 1920, 133. Cit. da Glaser 1930.
GLASER R. W., On the isolation, cultivation and classification of the so-called intracellular „symbiont" or „rickettsia" of Periplaneta americana. J. exp. Med. **51**, 1930, 59—82.
GLASER R. W., Cultivation and classification of „bacteroides", „symbionts" or „rickettsiae" of Blattella germanica. J. exp. Med. **51**, 1930, 903—907.
GRABER V., Ueber die embryonale Anlage des Blut- und Fettgewebes der Insekten. Biol. Centralbl. **11**, 1891, 212—224.
GRESSON R. A. R., Yolk-formation in Periplaneta orientalis. Quart. J. micr. Sci. **74**, 1931, 257—274.
GROSS J., Untersuchungen über die Histologie des Insectenovariums. Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ont. d. Tiere, **18**, 1903, 71—186.
HENNEGUY L. F., Les Insectes. Paris 1904.
HERTIG M., Attemptes to cultivate the bacteroids of the Blattidae. Biol. Bull. **41**, 1921, 181. Cit. da Gier.
HEYMONS R., Die Embryonalentwicklung von Dermapteren und Orthopteren. Jena 1895. Cit. da Buchner 1921.
HOLLANDE A. CH., L'insolubilisation des urates figurés dans les coupes histologiques. Bull. Hist. appl. **8**, 1931, 176—178.
HOLLANDE A. CH. et R. FAVRE, La structure cytologique du Blattabacterium cuenoti (Mercier) n.g., symbiote du tissu adipeux des Blattides. C. R. Soc. Biol. **107**, 1931, 752—754.
HOVASSE R., Bacillus Cuenoti Mercier, bactéroïde de Periplaneta orientalis, a la morphologie d'une bactérie. Arch. zool. exp. et gén. **70**, 1930, Notes et Revue 93—96.
IWANOFF P. P. u. K. A. MESTSCHERSKAJA, Die physiologischen Besonderheiten der geschlechtlich unreifen Insektenovarien und die zyklischen Veränderungen ihrer Eigenschaften. Zool. Jahrb. Abt. f. allg. Zool. u. Phys. d. Tiere, **55**, 1935, 281—348.
JAVELLY E., Les corps bactéroïdes de la blatte (Periplaneta orientalis) n'ont pas encore été cultivés. C. R. Soc. Biol. **77**, 1914, 413—414.
JUCCI C., Sulla presenza di batteriociti nel tessuto adiposo dei Termitidi. Arch. zool. it. **16**, 1422—1429 (Rend. 11° Congr. int. zool. Padova 1930).
KOCH A., Ueber die Symbiose von Oryzaephilus surinamensis (L.) (Coleoptera). Vorläufige Mitteilung. Arch. zool. it. **16**, (Atti 11° Congr. int. zool. Padova 1930), 1430—1436.
KOCH A., Die Symbiose von Oryzaephilus surinamensis L. (Cucujdae, Coleoptera). Z. f. Morph. u. Oekol. d. Tiere, **23**, 1931, 389—424.

KOCH A., Ueber das Verhalten symbiontenfreier Sitodrepalarven. Biol. Zentralbl. 53, 1933, 199—203.
KOCH A., Symbiosestudien. I. Die Symbiose des Splintkäfers, Lyctus linearis Goeze. Z. f. Morph. u. Oekol. d. Tiere, 32, 1936, 92—136.
KOCH A., Symbiosestudien. II. Experimentelle Untersuchungen an Oryzaephilus surinamensis L. (Cucujdae, Coleopt.). Z. f. Morph. u. Oekol. d. Tiere, 32, 1936, 137—180.
KOCH A., Symbiosestudien. III. Die intrazellulaire Bakteriensymbiose von Mastotermes darwiniensis Froggat (Isoptera). Z. f. Morph. u. Oekol. d. Tiere, 34. 1938, 584—609.
KOCH A., Die Bakteriensymbiose der Termiten. Verhandl. d. deutschen zool. Ges. 1938, 81—90.
LECAILLON A., Sur les enveloppes ovulaires de quelques Chrysomélides. Arch. anat. micr. 2, 1898, 89—117.
LECAILLON A., Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Chrysomélides. Arch. anat. micr. 2, 1898, 118—176, 189—250.
LWOFF A., Nature et position systématique du bactéroïde des Blattes. C. R. Soc. Biol. 89, 945—946, 1923.
MAC BRIDE E. W., Text-book of Embryology. Vol. I. Invertebrata. London 1914.
MERCIER L., Les corps bactéroïdes de la Blatte (Periplaneta orientalis): Bacillus Cuenoti (n. sp. L. Mercier). C. R. Soc. Biol. 58, 1906 (t. II), 682—684.
MERCIER L., Cellules à Bacillus Cuenoti dans la parois des gaines ovariques de la Blatte. C. R. Soc. Biol. 62, 1907, 758—759.
MERCIER L., Recherches sur les bactéroïdes des Blattides. Ach. f. Protistenk., 9, 1907, 346—358.
MERCIER L., Néoplasie du tissu adipeux chez des Blattes (Periplaneta orientalis L.) parasitées per une Microsporidie. Arch. f. Protistenk. 11, 1908, 372—381.
NEUKOMM A., Sur la structure des bactéroïdes des Blattes (Blattela germanica). C. R. Soc. biol. 96, 306—308. 1927.
NEUKOMM A., Action des rayons ultra-violets sur les bactéroïdes des Blattes (Blattela germanica) C. R. Soc. Biol. 96, 1155—1156, 1927.
NUSBAUM J. u. B. FULINSKI, Ueber die Bildung der Mitteldarmanlage bei Phyllodromia (Blatta) germanica L. Zool. Anz. 30, 1906, 362—381.
PARDI L., I corpi grassi degli insetti. Redia 25, 1939, 87—288.
PATTEN W., The development of Phryganids, with a preliminary note on the development of Blatta germanica. Quart. J. micr. Sci. 24, 549—602, 1884.
PIERANTONI, U., La simbiosi ereditaria negli Eterotteri. Arch. zool. it. 16, 1389—1391. (Rend. 11° Congr. int. zool. Padova 1930).
PIERANTONI U., Origine e sviluppo degli organi simbiotici di Oryzaephilus (Silvanus) surinamensis L. Atti R. Acc. Sci. fis. mat. Napoli 18, 1930. Cit. da Koch 1931.
PRENANT A., P. BOUIN, L. MAILLARD, Traité d'Histologie. T. I. Cytologie générale et spéciale. Livre II. Morphologie de la cellule (Prenant) Paris 1903.
SCHNEIDER K. C., Lehrbuch der vergleichenden Histologie. Jena 1902. Cit. da Buchner 1921.
SCHNETTER M., Morphologische Untersuchungen über das Differenzierungszentrum in der Embryonalentwicklung der Honigbiene. Z. f. Morph. u. Oekol. d. Tiere, 29, 1931, 114—195.
TIEGS O. W. and MURRAY F. V., The embryonic development of Calandra oryzae. Quart. J. micr. Sci. 80, 1938, 159—284.
WHEELER, W. M., The embryology of Blatta germanica and Doryphora decemlineata. J. of Morph. 3, 1889, 291—386.
WOLF J., Contribution à la morphologie des bactéroïdes des Blattes (Periplaneta orientalis L.) C. R. Soc. Biol. 91, 1924, 1180—1182.
WOLF J., Contribution à la localisation des bactéroïdes dans les corps adipeux des Blattes (Periplaneta orientalis L.) C. R. Soc. Biol. 91, 1924, 1182—1183.

The Pathogenicity of Aspergillus Nidulans

by

CHARLES H. DRAKE, PH.D[1].

(Department of Bacteriology and Public Health
State College of Washington, Pullman, Washington)

(25-2-1947)

Medical literature contains numerous references to infections with various species of the genus *Aspergillus*. Aspergillosis occurs in a variety of clinical forms. Commonly the surface of the body is affected as in otomycosis and infections of the skin and nails. In these cases, even where the organisms are actually growing on the body, there is little or no invasion of living tissue but rather a growth of the fungi in secretions or dead tissues. Invasion of living tissue does occur however, in pneumomycosis (pulmonary aspergillosis). The latter condition is common in birds and occasionally occurs in other animals and in man.

Since species of *Aspergillus* are common and wide-spread it is not surprising that they have been reported frequently from various pathological processes. Probably the majority of reported cases of infection with aspergilli represent only the chance isolation of contaminants that bear no causal relationship to the disease process. In the unquestionable cases of aspergillosis, particularly those in which living tissue is invaded, *Aspergillus fumigatus* is the organism usually found. Experimentally *A. fumigatus* readily infects laboratory animals especially birds and rabbits, causing a rapidly fatal disease. HENRICI (1939) has shown that this is related, in part at least, to the potent endotoxin demonstrable in the cell sap of this fungus.

Aspergillus nidulans has been reported from a number of different disease conditions and is often referred to as being pathogenic for experimental animals, DODGE (1935). In view of the findings of HENRICI with *A. fumigatus*, a study of the experimental pathogenicity of *A. nidulans* was undertaken.

Previous Experimental Studies

Aspergillus nidulans was first isolated by EIDAM (1883, 1887), who reported it to be pathogenic for rabbits. However, his experiment demonstrating pathogenicity consisted of the injection of two rabbits with overwhelming doses of conidia which caused death in three days with multiple infarcts in various organs. The doses used were so large that multiple capillary thrombosis was the most likely cause of death and in no way indicated a true pathogenicity on the part of the organism. LINDT (1889) also

1) A portion of this work was originally done at the University of Minnesota.

reported on the pathogenicity of this fungus. He found that the intravenous injection of conidia killed rabbits only when large doses were used. The animals frequently showed embolic phenomena and either died in a few days or survived indefinitely. One animal showed a twisting of the neck, but no paralysis, on the eighth day after injection, with death following on the tenth day. Only a few kidney lesions were found on autopsy. One animal showed multiple abscesses containing mycelium in the heart muscle. He concluded that large doses were necessary as only a few conidia germinated in the body. The majority of the lesions were found in the kidneys with a few in the diaphragm. HEIDER (1890) injected one rabbit with a heavy suspension of ascospores separated from the conidia by differential filtration. The animal died on the sixth day. Autopsy revealed greatly enlarged kidneys which on microscopic examination showed multiple abscesses containing mycelium developing from the ascospores. Slight germination of ascospores, but no mycelial development or lesions, was found microscopically in the liver and lungs.

OTA (1923) found a closely related variety, *A. jeanselmei,* causing a lesion of the fingernails, and records it as being very pathogenic for rabbits and guinea pigs. Two guinea pigs were inoculated, one intraperitoneally and subcutaneously and the other only intraperitoneally. The first animal died in eight days and showed a few circumscribed abscesses on the mesentery and uterine surface. The second animal was killed for autopsy and showed only two small subcutaneous abscesses. A small rabbit inoculated intravenously died in three days with intense congestion of the lungs and multiple abscesses of the kidney.

Natural Infections

A few cases have been reported of natural infections with *Aspergillus nidulans.* DODGE (1935) refers to this species as, "frequently found in mycetomas, usually of the black grain variety". The three mycetomas reported in the literature as caused by *A. nidulans* include two with white to greyish granules and one with definitely black granules. However, question arises as to the validity of some of these cases.

NICOLLE and PINOY (1906) reported a mycetoma of the foot with white to greyish granules caused by *A. nidulans* var. *Nicolle.* This case was carefully studied culturally and microscopically and seems to be the most valid case of a naturally occurring mycetoma caused by *A. nidulans.* The organism was nonpathogenic for rabbits and monkeys by subcutaneous and intravenous inoculation. A minimal lesion with spontaneous resorbtion was produced in a rat by inoculating the foot along with a fragment of reed. PINOY and MASSON (1915) reported a mycetoma in the lung of an ass caused by *A. nidulans* var. *Cesari,* but THOM (1926) considers this organism to be a variety of *A. fumigatus.*

A human mycetoma with lesions of the arm and head was reported by PUESTOW (1929) with *A. nidulans* the only organism recovered by culture. However, the description of the microscopic findings from the lesion and exudate raises some doubts as to whether or not this was actually a mycetoma since no mycelial forms were found. Injection of guinea pigs with pus from the lesions or with cultures of *A. nidulans* isolated from the pus gave negative results.

Aspergillus nidulans has been reported from otomycosis by several workers; NEVEU-LEMAIRE (1921), SIEBENMAN (1889). SIEBENMAN has also reported this fungus as one of several causing pharyngomycosis in the terminal stages of illness in a patient with cardia disease.

OTA (1923) and WEILL and GAUDIN (1919) have reported *A. nidulans* as a cause of lesions around the fingernails and toenails.

It can be seen from the above review of the literature that the question of true pathogenicity of *Aspergillus nidulans* is still open to some doubt. Most of the reported animal experiments were based on the injection of very large doses of conidia which resulted in embolic phenomena. The ability of a fungus to grow in necrotic infarcts is hardly a true measure of pathogenicity and certainly does not show the organism to possess invasive powers. Most of the reported human infections have either been superficial, without distinct invasion of tissue, or else the proof of the actual causative role of the organism in the production of the lesions has been incomplete. The mycetoma of the foot reported by NICOLLE and PINOY appears to be the only unquestionable human infection with invasion of the tissues.

There remains to be considered a special group of observations and experiments by NANTA (1929, 1930) and by PINOY and NANTA (1927) on splenomegaly, related to or identical with Banti's disease, which they consider to be caused by *Aspergillus nantae,* an organism closely related to *A. nidulans.* Their organism differs in growing more slowly, in having smaller conidia, sterile perithecia, and a slight color difference. They have produced two types of disease in rabbits by the injection of this organism. An acute disease causing death in eight days was produced by intravenous injections. Symptoms consisted of loss of weight and paralysis of the hind quarters. At autopsy most of the lesions were found in the kidneys which showed an acute purulent, hemorrhagic nephritis with many small circumscribed abscesses. The abscesses contained abundant mycelium and conidia. The spleen showed areas of congestion with active, almost necrotic, inflammation. There was a definite increase of pigment, but no mycelium could be found in the spleen. The lungs were congested and showed leucocytic infiltration around the bronchi. The larger bronchi showed active inflammation with pus or blood in the lumen. No fungi were found in the lungs. The liver showed a few areas of hemorrhage and leucocytic infiltration. The chronic disease was produced by first injecting rabbits with ferrous saccharate and then giving multiple intravenous injections of the fungus. Two of ten rabbits showed splenic hypertrophy when killed for autopsy. The authors point out that two types of lesions were produced; one a purulent focus usually wih abundant fungi and the other a granulomatous lesion with giant cells and active fibroblasts. In the latter type of lesion fungi were scarce, occasionally being found in giant cells. In the granulomatous lesions the fungi were altered in appearance with degenerative changes, such as spinous projections from strands of mycelium, and actinomycetoid forms were found. As a rule cultures were positive only from the purulent lesions. The enlarged spleen contained iron encrusted fibres, and the authors believed that they could race a transition from the fungus to the splenic fibres found in Banti's disease. This observation, together with the occasional positive culture from man was the basis for the contention that *Aspergillus nantae* is the cause of BANTI's disease.

Their observation of ungerminated conidia shows that the purulent foci were of embolic origin and gives no proof of tissue invasion by the fungus. The findings in the chronic disease were only occasional and were made on rabbits previously treated with ferrous saccharate which might have played some role in the hyperplasia of the reticuloendothelial tissues. REIMAN and co-workers (1929, 1931) have shown that fungi can only occasionally be cultured from the spleen in BANTI's disease, and those found belong to several genera and are not pathogenic for laboratory animals. Furthermore, REIMAN et al. have traced the origin of the filaments in the siderotic GANDI-GAMNA nodules to normal tissue fibres and have shown that these nodules may be present in other diseases and absent in the primary splenomegaly characteristic of BANTI's disease.

Experimental Methods and Organism

The strain of Aspergillus nidulans used in this investigation came from the collection of the late Dr. A. T. HENRICI and was originally isolated from soil. At the time of the original isolation the fungus produced typical perithecia, but this property was lost on repeated subculture and no perithecia were formed by this strain at the time is was used for the work reported here. However, the other characteristics remained constant, and typical conidia were produced in abundance. Cultures were made on modified SABOURAUD's agar (4 % glucose, 1 % peptone) slanted in 25 mm. culture tubes and incubated at 37° C. Four to five days growth gave an abundance of conidia. For injection the conida were suspended in 5 to 10 ml. of sterile 0.9 % saline by adding the salt solution to the tube and rubbing the surface of the growth with a sterile inoculating wire until most of the conidia were removed. The suspension was filtered through sterile gauze to remove the larger particles and used for injection. Dosages were calculated on the basis of the original growth on the slant. The cell sap was prepared by the method of Henrici. The microscopic pathology was studied by sections stained with eosin-hematoxylin or by the GRAM-WEIGERT method.

Experiments With Cell Sap

In view of the findings of HENRICI with the cell sap of *Aspergillus fumigatus* a number of experiments were performed with the cell sap of *A. nidulans.*

Ten rabbits were injected with varying doses of the cell sap of A. nidulans with the following results: One rabbit, 3825, died two days after receiving 10 ml. cell sap intravenously. On autopsy the liver was firm, pale and fatty, and the lungs and kidneys were somewhat congested. Microscopically the liver showed focal necrosis and patchy fatty degeneration. The lungs were congested and edematous and the alveoli filled with erythrocytes and serum. The spleen was congested and pigmented; the kidneys were also congested and the lumen of many tubules was filled with blue-staining, very fine, granular material. Another rabbit, 3826, showed curious symptoms following several injections of cell sap. An initial injection of 10 ml. cell sap intravenously caused no reaction, but signs of mild shock appeared immediately when the animal was re-injected with the same dose three weeks later. The following day complete flaccid paralysis was evident which persisted with slow improvement for ten days. A third injection three weeks after the second caused no reaction. This animal was killed by its cage mate one week after the last injection and showed no lesions either grossly or microscopically. A third rabbit, 3844, was repeatedly injected intravenously,

receiving a total of 50 ml. cell sap in five injections. A skin test with the same material was negative, and following death from an intercurrent infection no changes attributable to the cell sap could be found.

Two rabbits, 3841 and 3842, died of acute anaphylaxis following a second or third intravenous injection of cell sap, and two other rabbits, 3839 and 3858, died of delayed anaphylaxis (12 to 24 hours after injection) following a second or third intravenous injection. One of these animals showed large areas of liver necrosis on microscopic examination.

Three other rabbits received repeated injections of cell sap with total doses of from 48 to 85 ml. each. No reactions were observed in these animals and skin tests with cell sap showed no sensitization. However, a precipitin test with the serum of one rabbit gave a positive reaction with a 1 : 10 dilution but not with a 1 : 100 dilution of a cell sap of A. nidulans. Precipitin tests with the cell sap of A. fumigatus were negative in all dilutions.

Twelve guinea pigs were injected with cell sap of A. nidulans with some that varied results which, on the whole, differed from those elicited in rabbits.

One animal died 36 hours after an intraperitoneal injection of 10 ml. cell sap and on autopsy showed congested lungs and considerable gelatinous exudate in the peritoneal cavity. Microscopically the tissues were normal except the spleen, the sinusoids of which were packed with macrophages.

That the cell sap would bring about a state of anaphylactic sensitivity in guinea pigs following a primary injection was demonstrated by the death from anaphylactic shock of two animals following a second intraperitoneal injection one month later. However, if a small amount of cell sap was used for the shock dose it was not effective. In utero sensitization was demonstrated in one case by injecting a female guinea pig with two doses of cell sap which brought about a state of sensitivity as shown by a skin test with the same material. One month after the skin test the animal gave birth to two young which were injected intraperitoneally with 2 ml. cell sap at two weeks of age. Both of the young guinea pigs died of acute anaphylaxis. A control animal one week of age showed no reaction to the same dose of cell sap.

Sensitivity to the cell sap was not accompanied by sensitivity to live conidia, a point of some interest in view of the experiments with conidia to be discussed later. Four guinea pigs were injected intraperitoneally or subcutaneously with 5 ml. cell sap and later skin tested with small doses of the same material. Three of the animals gave a positive skin test two weeks after the primary injection. All of the animals were then injected intraperitoneally with the living conidia from ½ slant; no reaction resulted from the injection.

Summarizing the effect of cell sap on rabbits and guinea pigs, it should be noted that it is a better allergen for guinea pigs than for rabbits but is capable of sensitizing both animals. In guinea pigs the sensitivity is often great enough to give positive skin tests. Two animals died following a single injection of cell sap, but otherwise there was no indication of primary toxicity. These deaths were probably due to non-specific phenomena since most of the animals tolerated large and repeated doses of the material if the injections were spaced so as to avoid anaphylactic sensitization. Large doses could be administered subcutaneously without producing local symptoms. Sensitization to the cell sap was not accompanied by sensitization to conidia.

Experiments with Live Conidia

The injection of conidial suspensions into rabbits and guinea pigs gave differing results in the two species so that they will be considered as two separate groups.

I. Experiments on Rabbits

A. Single Injections

Four rabbits injected with large doses (1 slant) of conidia died of embolic phenomena after either the first or second injection. Death occurred in twenty-four hours or less, and emboli of conidia could be demonstrated in the larger pulmonary vessels. In most of the animals the lungs showed fresh infarcts. Death from such a cause has no bearing on the possible pathogenicity of the fungus, and these animals will not be considered further.

In a second group of six rabbits death occurred after a single injection of conidia, but the time interval and pathological findings indicate that death was not of embolic nature.

Rabbit 3821 was injected intravenously with conidia from ½ slant. Twelve days later incoordination of the hind legs was evident, which by the fourteenth day had progressed to complete spastic paralysis. The animal was killed seventeen days after the injection since it was completely paralyzed and in a dying condition. No gross lesions were found at autopsy.

Rabbit 3823 was also injected at the same time and with the same dose of live conidia as the preceeding animal. A similar paralysis developed and the animal died on the fifteenth day after the injection. At autopsy the liver was enlarged, and small white nodules were evident in the cortex of the kidney.

Rabbit 3824 was also injected at the same time and with the same dose of live conidia. Similar symptoms of incoordination and partial paralysis appeared but were milder than in the two rabbits discussed above. On the twentieth day the animal was very thin but had regained the use of its legs. However, on the twenty-fourth day a flaccid paralysis appeared, and the animal was sacrificed *in extremis*. On autopsy the kidneys were swollen and showed many small white spots in the medulla. The liver was pale and mottled; the lungs showed solid, sunken areas. The brain and spinal cord appeared normal.

Rabbit 3910 was injected intravenously with the conidia from 1 slant and died six days later. Autopsy showed swollen kidneys studded with miliary lesions. Other organs appeared normal.

Rabbit 3911 was injected intravenously with the conidia from 1 slant. Six days later a slight paralysis with a pronounced twisting of the neck appeared. After a slight remission of symptoms the paralysis increased in severity and a marked loss of weight was evident. On the eighteenth day the animal was skin tested with 0.5 ml. cell sap. In twenty-four hours a very congested, edematous reaction was observed. The animal remained very weak and partially paralyzed and three weeks after inoculation was sacrificed. Autopsy showed only pale kidneys and a congested liver.

Rabbit 3912 was injected intravenously with conidia from $^1/_5$ slant. A slow loss of weight and increased sluggishness was observed after one week. Eighteen days after inoculation a skin test of 0.5 ml. cell sap gave a positive reaction in twenty-four hours showing a 3 cm. area of congestion and edema which faded slowly. One month after inoculation spastic paralysis was evident and the animal was very weak and unable to walk. Five weeks after inoculation the animal was found dead. No gross lesions were found on autopsy.

It will be noted that at least five of the above animals exhibited a rather characteristic chain of nervous symptoms following a single intravenous injection of the conidia from $^1/_5$ to 1 slant. Similar symptoms have been reported by others. LINDT noted twisting of the head in a rabbit inoculated with ascospores of *Aspergillus nidulans*. This phenomena appears to be rather common after injection of many different fungi. PINOY and NANTA noted paralysis of „posterior movement" in a rabbit inoculated with *A. nidulans* var. *nantae*. Loss of weight following injection has been noted by many authors.

In the above animals nervous symptoms appeared five to eleven days

after injection and consisted of weakness, twisting and nodding of the head, partial or complete paralysis of the hind legs, usually spastic, with incoordination of the hind legs preceeding paralysis. These symptoms were not associated with any constant pathological findings, either gross or microscopic. A gross neurological examination of the brains of these animals made by the kindness of Dr. J. C. McKINLEY failed to show any cause for the symptoms. The symptoms and lack of lesions would suggest the presence of some toxic substance in the conidia. Two rabbits injected with heat-killed conidia (60° C. for 30 minutes) showed no symptoms which would indicate that the hypothetical toxic substance was thermolabile or else associated with the living organisms.

A point of some interest is the observation that these animals gave positive skin tests to cell sap whereas rabbits injected with cell sap alone gave negative skin tests. This type of reaction is analagous to the tuberculin reaction.

Microscopic Pathology.

The microscopic pathology varied to some extent with the time of death after inoculation. Special attention was given the spleen in view of the suggestions that such infections might be related to BANTI's disease.

This organ showed congestion in four of the six rabbits, an increase of pigment in four and was fibrosed to some degree in four. Two of the animals, 3910 and 3833, showed scattered LANGHANS giant cells close to or enclosing bits of mycelium, some of which appeared to be growing.

The kidneys of two animals, 3911 and 3912, appeared normal. The kidneys of rabbits 3910 and 3821, dying in five days and two weeks respectively, showed multiple abscesses with growing mycelium. Often the lumen of a tubule was packed with mycelium and the walls destroyed by a leucocytic infiltration. The mycelium in the lesions of the rabbit that survived two weeks showed an abnormal thickening and distortion of the walls. The remaining two rabbits, 3823 and 3824, dying in two weeks and three and a half weeks after inoculation, also showed marked kidney lesions but of a somewhat different character. Although a purulent exudate was still the dominant feature there was a development of giant cells and tubercles, slight in the rabbit dying early and more extensive in the animal surviving three and a half weeks. Mycelial forms were still present but in many cases could be seen developing into actinomycetoid forms.

The liver showed slight cytoplasmic degeneration in three animals, 3821, 3824 and 3912. In rabbit 3911 there were scattered nodules (composed of fibrous tissue with a few leucocytes) that had the appearance of healed tubercles. The same appearance was seen in 3823, but in additon there were scattered giant cells and incompletely healed tubercles, some of which contained mycelium. The liver of 3910 showed large necrotic areas with leucocytic infiltration and many young tubercles with young giant cells and actively growing mycelium.

The lungs of three of the animals appeared normal, but the other three rabbits, 3910, 3823 and 3924, showed scattered giant cells and tubercles. Fungi were observed occasionally in the lung tubercles of rabbit 3824 but were not found in the others.

Microscopic examination of the other organs, including the brains, showed no lesions.

These animals show a pathological picture that varies with the time of survival. The longer death was delayed, the more apparent was the transition from purulent inflammation and abscesses to tubercles and granulomatous lesions. This was correlated with a morphological change in the fungus from ordinary mycelium to actinomycetoid forms in the tuberculous type of lesion.

B. Multiple Injections of Conidia.

In the literature of medical mycology there are scattered references indicating that repeated inoculations of a fungus may give rise to a progressive infection when a single inoculation may fail to do so. In view of this a series of rabbits was injected repeatedly with live conidia.

Two rabbits were injected subcutaneously several times with live conidia and later intravenously. Rabbit 389 received six subcutaneous injections of the conidia from ½ to 1/5 slant over a period of ten weeks. The injections caused a diffuse redness which faded after two days leaving a white nodule varying in size from a pea to a hazelnut. The last few injections gave more pronounced reactions. Two weeks after the last subcutaneous injection the rabbit was inoculated intravenously with the conidia from ½ slant. The animal appeared normal for over two weeks and then developed a purulent nasal discharge and marked exophthalmia which persisted until the death of the animal three weeks after the intravenous injection. On autopsy the lungs were congested and studded with many white tubercles. The other organs appeared normal. Microscopic study showed a heavily pigmented spleen, normal kidneys, and a congested liver with some atrophy of the cord cells. The lungs were congested and filled with tubercles containing actinomycetoid forms of the fungus. Cultures gave a pure growth of *Aspergillus nidulans*.

Rabbit 3810 was treated similarly to the previous animal receiving the same series of subcutaneous injections. The second and third subcutaneous injections resulted in ulcer formation, but subsequent injections caused lesser reactions. After an intravenous injection of conidia from 1 slant the animal remained normal for over two weeks and then developed a purulent nasal discharge and exophthalmia. These symptoms increased in severity; three weeks after the intravenous inoculation slight paralysis was evident. The animal became completely paralyzed a month after the last inoculation and died four days later, five weeks after the intravenous inoculation of live conidia. Gross lesions consisted of a massive fibrinous pleural exudate and a mottling of the liver. Microscopically the spleen was heavily pigmented, the liver was congested and showed atrophy of the cord cells. In the medulla of the kidney there was a young tubercle with a central actinomycetoid form of the fungus. The lungs showed a leucocytic infiltration with many free macrophages in the alveoli (terminal pneumonia). One large tubercle found in the lungs contained actively growing mycelium.

Summarizing the above experiment it would seem that the previous injection of conidia by the subcutaneous route had little effect on the course of the disease following subsequent intravenous inoculation. Slight skin sensitization was apparently obtained in one animal as indicated by ulceration which followed some of the subcutaneous injections. Similar results were obtained with another animal that was immunized by repeated injections of cell sap before being inoculated intravenously with the conidia from 1 slant. The subsequent disease and autopsy findings were almost identical with those of the two animals discussed above.

A further experiment was carried out to determine the effect of repeated intravenous injections of small doses of live conidia. Two rabbits, 387 and 388, were injected intravenously with the conidia from 1/5 slant. The injection was repeated one week later, and a third inoculation of conidia from 1/3 slant was made sixteen days after the primary injection.

One week after the last injection rabbit 387 developed a twisting of the neck, loss of weight and a lack of coordination in the hind legs. The paralysis increased in severity until there was a complete spastic paralysis of the hind legs with exaggerated knee jerks. The animal was killed *in extremis* three weeks after the last injection. Autopsy showed enlarged pale kidneys, an enlarged mottled liver and an enlarged firm spleen. Microscopically the kidneys showed fatty degeneration of the tubules with patchy leucocytic infiltration, and the spleen showed hyperplastic lymphoid nodules. The other organs appeared normal.

Rabbit 388 showed weakness and loss of weight after the third injection and was reinjected with the conidia from 1/3 slant six weeks after the first inoculation. Within a week partial spastic paralysis with exaggerated knee jerks appeared in the hind legs. Ten days later there was no improvement, and the animal was reinjected intravenously with the conidia from 1/3 slant. Two weeks after the final injection the animal was chloroformed in a dying condition. Autopsy showed an enlarged firm spleen, and pale fatty kidneys. Microscopically the kidney showed slight fatty degeneration with scattered tubercles containing actinomycetoid forms and a few tubercles with actively growing mycelium instead of actinomycetoid forms. The spleen showed congestion and hyperplasia of the lymphoid nodules.

Another rabbit, 3822, was injected intravenously with the conidia from ½ slant and developed the usual train of spastic paralysis and other symptoms. Improvement was evident after two weeks, and one month later the animal was reinjected with the same dose of conidia. The animal was found dead one week after the final injection. Autopsy and microscopic examination showed a mottled liver with many poorly developed tubercles containing usually actinomycetoid forms but sometimes actively growing mycelium. The lungs were riddled with tubercles containing actinomycetoid forms which could be seen forming from conidia or from previously developed mycelium. the kidney showed a few abscesses with actinomycetoid forms. The spleen was congested, pigmented and showed scattered Langhans giant cells, a few of which contained fragments of fungi. The heart showed a few poorly defined abscesses with growing mycelium.

Rabbit 3921 received the conidia from 1/5 slant intravenously and two weeks later the conidia from 1/10 slant by the same route. A skin test with cell sap three days after the second injection showed a positive reaction in twenty-four hours which slowly faded over a five day period. Five days after the second injection, loss of weight and partially paralysis were evident and persisted until the death of the animal. One and a half months after the first injection the animal was reinoculated intravenously with the conidia from 1/3 slant and this injection was repeated a month later. Paralysis became more pronounced and the animal was found dead four days after the last injection. Autopsy showed multiple hemorrhagic areas in the lungs, but the other organs appeared normal. Microscopic examination showed the lungs to be studded with tubercles containing actinomycetoid forms developing from spores or from previously growing mycelium. Scattered actinomycetoid forms were found throughout large areas of tuberculous pheumonia. The liver, kidney and heart showed many healing tubercles but no fungi were found.

Rabbit 3914 was injected intravenously with the conidia from 1/25 slant and eighteen days later skin tested with 0.5 mi. cell sap. A positive skin test appeared in twenty-four hours and persisted four days. Four weeks after the primary injection a partial paralysis appeared which persisted until the death of the animal. Seven weeks after the first inoculation the rabbit was reinjected intravenously with the conidia from 1/3 slant and two weeks later again injected by the same route with the conidia from 1 slant. Twenty-four hours later the animal was found dead; autopsy showed congestion of the lungs. Microscopically the liver was congested with considerable pigmentation and atrophy of the cord cells. The lung was deeply congested with many heart-failure cells and a diffuse leucocytic infiltration and fibrosis. One area was definitely pneumonic. Scattered tubercles but no fungi were found. The other organs appeared normal.

Rabbit 3915 was also injected intravenously with the conidia from 1/25 slant and two weeks later was reinjected with the conidia from 1/10 slant. A skin test three days after the second injection gave a distinctly positive reaction which faded by the fifth day. A similar chain of paralytic symptoms appeared as in the previous rabbit, and seven weeks after the first injection the animal was reinoculated with the conidia from 1/3 slant. One month later the paralysis had disappeared, and the animal received another intravenous injection of conidia from 1 slant. The paralysis reappeared in a few days and persisted for the rest of the experiment. A fourth injection of the conidia from 1 slant was made fourteen weeks after the third injection. This resulted in a mild shock with apparent recovery, but the animal was found dead the next day.

Autopsy showed a mottled liver and multiple abscesses in the lungs especially at the base of the lobes. Microscopically the liver showed extreme congestion and atrophy of the cord cells. The kidney showed a single tubercle in the medulla containing an actinomycetoid form developing from a conidium. The greatest reaction was observed in the lungs which showed large areas of consolidation that had the appearance of tuberculous pneumonia throughout which were scattered actinomycetoid froms. Multiple abscesses were present with proliferating mycelium that invaded the bronchi. The mycelium was normal in appearance. Scattered tubercles enclosing mycelium or actinomycetoid forms and scattered free giant cells were found. In the less involved portion of the lungs the tubercles were well developed. Actinomycetoid forms were scattered throughout otherwise normal lung tissue, and these could be seen to be forming directly from conidia in most cases.

Rabbit 3843 was previously immunized to cell sap to see what effect such an immunity might have upon subsequent multiple injections of live conidia. Fourteen intravenous and intraperitoneal injections of cell sap were made over a six month period resulting in sufficient antibody formation to give a positive precipitin test with the homologous antigen. The animal was then injected intravenously with the conidia from ½ slant. Twenty days later the rabbit was reinjected with the conidia from $^1/_5$ slant and this dose was repeated twice more at five day intervals. Slight paralysis of the hind legs appeared, and the animal was again injected with the conidia from $^1/_5$ slant five days after the fourth injection. Mild shock with recovery occurred, but the next day the animal appeared weak and death occurred three days after the last injection. Gross examination revealed pale fleshy lungs with areas of necrosis and many fine white tubercles. The liver was pale. Microscopically the liver showed fatty degeneration and a few fibrous nodules, the spleen showed a few abscesses and considerable pigmentation. Many abcesses, usually enclosing actinomycetoid forms, were found in the kidneys and numerous tubules were filled with pus. Scattered actinomycetoid forms were found throughout the section. The lungs showed fibrosis, interstitial pneumonia, and contained numerous abscesses and tubercles in which actinomycetoid forms were frequently found. Actively growing mycelium with acidophilic walls was seen in a few of the abscesses. The rest of the organs were normal.

The significance of the pathological findings in these rabbits will be considered later.

II. Experiments on Guinea Pigs.

When a similar series of experiments was undertaken in guinea pigs rather astonishing results were obtained. Preliminary experiments showed that a primary intraperitoneal injection of live conidia seemed to have no effect on these animals, but a second injection was frequently followed by death or extreme illness within twenty-four hours. The dosage, the time interval necessary for sensitization and the duration of the sensitivity were important factors. This reaction seems to be identical with, or closely related to, the reaction observed by NAKAYAMA (1906) with *Nocardia asteroides*. It differs from anaphylaxis in that a particulate antigen is used and in that immediate symptoms of shock do not appear.

The importance of the dosage of conidia injected is shown by the following experiments.

Two guinea pigs were injected intraperitoneally with the conidia from ½ slant; three weeks later a second injection of conidia from $^1/_5$ slant was injected by the same route. Both animals survived and neither showed any symptoms as a result of the two injections.

Five guinea pigs received an intraperitoneal injection of conidia from ½ slant and three weeks later were reinjected with conidia from 1 slant. Two of these animals showed symptoms of severe shock but recovered; the other three died within twenty-four hours.

Three guinea pigs were given an intraperitoneal injection of conidia from 1 slant and this injection was repeated three weeks later. Two of the animals died in shock, and the other showed severe symptoms but survived.

Two guinea pigs were tested at greater intervals. One animal was given a primary intraperitoneal injection of the conidia from 1 slant, and six weeks later was skin tested with cell sap. The skin test gave a positive reaction. One week later (seven weeks after the primary injection) the animal was given a second injection of conidia from 1 slant. Death occurred in twenty-four hours. The second animal was given a sensitizing dose of conidia from ½ slant. This was repeated sixteen weeks later and the animal died in twenty-four hours.

The autopsy findings of these animals will be considered later.

Since it was found that guinea pigs would give a positive skin test to cell sap when previously injected with either cell sap or live conidia, the effect of a primary injection of cell sap and a later injection of live conidia was tested. Six animals were given one or more injections of cell sap either intraperitoneally, subcutaneously, or both. Four of the guinea pigs were known to give positive skin tests. Three to four weeks after the first injections the animals were given an intraperitoneal injection of live conidia. No reaction occurred.

Living conidia are apparently necessary for the reaction since another experiment on five animals indicated that a primary injection of heat-killed conidia did not sensitize to a second injection of either heat-killed or living conidia.

The effect of multiple, small, intraperitoneal injections of live conidia was also tested in guinea pigs. Six animals were injected intraperitoneally three to six times with doses of from $^1/_{10}$ to ½ of the conidia from a slant at intervals of from one to two weeks. All of the animals succumbed, but symptoms of shock were not observed. Constant autopsy findings were dense adhesions of the omentum and abdominal viscera with a recent peritonitis from the last injection. Microscopic examination showed no invasion of the organs, but only surface lesions of the abdominal viscera consisting of peritonitis with varying degrees of connective tissue formation from organization of the fibrinopurulent exudate. Occasional abscesses were found in the connective tissue masses, but they contained only clumps of conidia and fragments of mycelium with no evidence of growth of the fungus. Four of the animals showed focal necrosis and fatty degeneration of the liver. The death seemed to be attributable to the physiological disturbances caused by the dense adhesions although a toxic factor in the conidia may have played some role since most of the animals showed degenerative changes in the liver. Over the course of the experiment the animals showed a progressive loss of weight and did not appear well. They differed in this respect from the animals receiving a single large injection since the latter appeared well until after the second injection.

Histopathology of the Lesions in Rabbits and Guinea Pigs

I. Guinea Pigs

The differences in the reaction of rabbits and guinea pigs to the injection of live conidia is shown further by the histology of the lesions.

In guinea pigs the intraperitoneal injection of conidia was followed by a slight, acute, fibrino-purulent, exudative inflammation. When animals were sacrificed there was gross evidence of mild peritonitis. Clumps of conidia were surrounded by a small amount of fibrin; a slight amount of serous fluid was present in the abdominal cavity. The mesenteric vessels were slightly congested. This reaction, never fatal, soon subsided with

the formation of dense adhesions by organization of the exudate. The conidia were clumped together and surrounded by a mass of leucocytes forming an abscess in which the predominant cell types were polymorphonuclear cells and macrophages. The abscess was securely walled in by connective tissue, did not spread, and the conidia and bits of mycelium showed no evidence of growth. Uncommonly giant cells were seen in or close to the walls of an abscess. Occasionally the centers of the larger abscesses were necrotic, in which case evidence of slight mycelial proliferation could be seen. Tubercles were rarely or never formed.

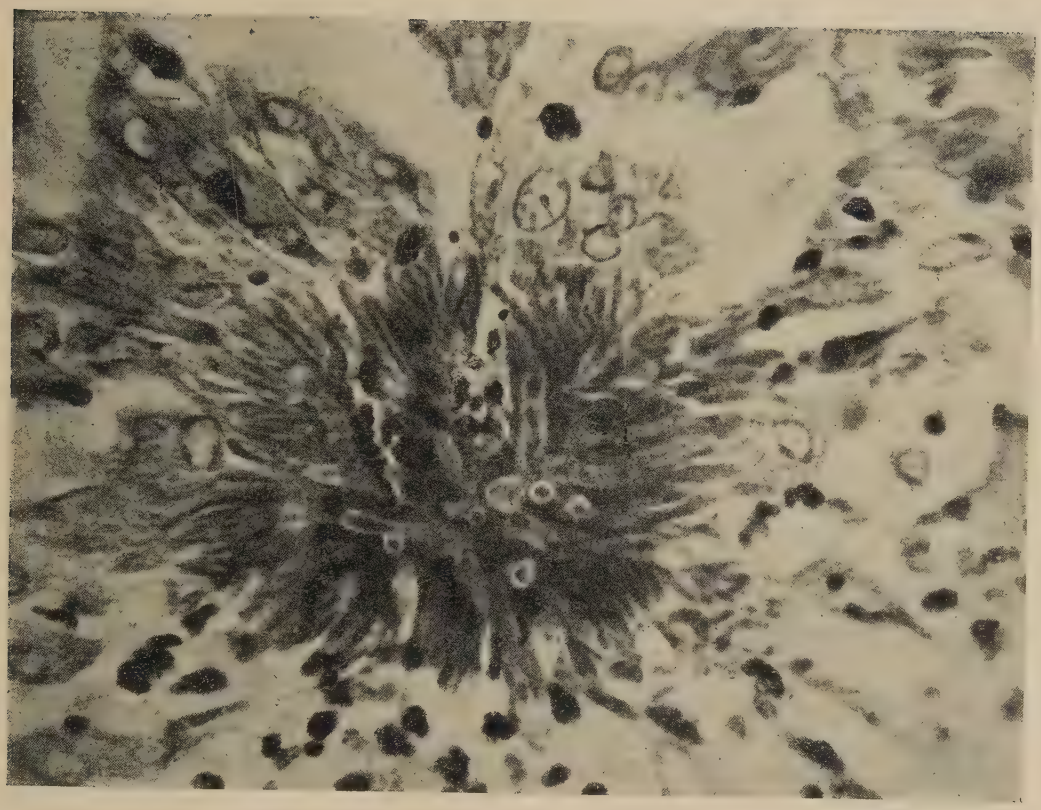
In animals dying after a second or later injection there was found an acute peritonitis superimposed on the almost healed previous inflammation. There was no qualitative difference between animals sacrificed after a primary injection and those dying after a second injection, but quantitatively the reaction was much more severe. Gross examination showed a marked peritoneal reaction with abundant sero-purulent exudate and much free fluid. The omentum was intensely congested, covered by a shaggy exudate and showed an edematous thickening. The conidia were imbedded in thick fibrino-purulent masses. Many hemorrhagic areas were present in the mesentery, parietal peritoneum and especially in the omentum. Microscopically the liver showed fatty metamorphosis or cytoplasmic degeneration, occasionally with focal necrosis. Scattered fibrous nodules were sometimes seen in various organs and seemed to represent reactions to spores which had been carried from the site of injection. Other than this most of the abdominal organs showed no pathology except the inflammatory changes on the peritoneal surface. In the spleen and especially in the pancreas the inflammatory reaction and abscesses were apt to extend into and partially destroy the parenchyma. The most constant findings were in the omentum. Guinea pigs sacrificed at intervals showed all stages of the inflammatory reaction in this structure. Shortly after injection the omentum showed a marked congestion and inflammation; the surface was covered by a fibrinopurulent exudate. After a longer interval the inflammation subsided with the formation of abcesses containing inactive conidia.

A second injection of conidia resulted in peritonitis which caused an even greater thickening of the omentum with a second acute inflammation superimposed on the partially healed previous one. The second reaction showed a more outstanding leucocytic infiltration and edema of the entire thickness of the omentum, as well as the production of a surface exudate. The inflammatory process frequently extended and involved the pancreas, diaphragm, and spleen with adhesions to these organs. This sometimes caused considerable destruction of pancreatic tissue. In spite of the marked inflammatory reaction there was little evidence of growth of the fungus. Only two guinea pigs showed any growth of mycelium and this was confined to the necrotic centers of large abscesses. The growth was slight and showed no tendency to spread from this focus.

II. Rabbits

The lesions in rabbits were quite different and showed a progressive change in character with the lapse of time following an injection.

An intravenous injection resulted in abscess formation in various organs, especially in the kidneys. Microscopially the abscesses were composed of centrally located filaments of mycelium surrounded by an infiltra-



Actinomycetoid granule of Aspergillus nidulans in granulomatous tissue. Oil immersion lens.

tion of macrophages and polymorphonuclear leucocytes. The mycelium was similar to that from cultures except that often the walls were thicker and acidophilic, possibly from a deposit on the surface of material from the host or a secretion from the fungus. Usually there was no well developed fibrous wall around the lesions.

After an appreciable time interval, with a minimum of about ten days, two different lines of development could be differentiated. One was a spontaneous regression and replacement with fibrous tissue. More commonly however, a definite progressive change occurred in the lesions. Giant cells appeared near the periphery of the abscess, a layer of epithelioid cells was formed and the lesion took on the appearance of a tubercle with a purulent central portion.

At the same time a change took place in the morphology of the fungus. The filaments of mycelium became bent and twisted, and the walls developed numerous close set spinous projections. As this process continued, there was formed an actinomycetoid granule with a central portion of small pieces of mycelium and a periphery of radiating clubs which developed from the spinous projections. These actinomycetoid granules could be found only in animals in which giant cells and tubercle formation could be demonstrated.

If a second injection of conidia was made in a previously inoculated animal, the actinomycetoid granules could be observed to develop directly from germinating conidia without the previous formation of mycelium. In the case of a second injection the lesions were more frequent in the lung than in the other organs although they could be found in the liver and spleen in some cases and were frequent in the kidneys. In animals with widespread lesions after a second injection, further injections sometimes caused the formation of numerous actinomycetoid forms with only slight tissue reaction around them. In animals receiving several injections the lungs often showed areas of consolidation comparable to tuberculous pheumonia.

The lesions, both purulent and granulomatous, did not vary in histological structure in the different organs. Pathological changes other than purulent or granulomatous lesions were infrequent. Fatty degeneration, congestion, and atrophy of the cord cells were occasionally seen in the liver. Careful microscopic examination of the spinal cord, medulla and brain showed no lesions despite the marked symptoms of central nervous system involvement.

In view of the work of Nanta on splenomegaly special attention was paid to this organ. In sixteen rabbits that received injections of live conidia no fibrotic hyperplasia was found. Splenic changes were inconstant and never of such a character as seen in primary splenomegaly. Fungi were found in only four spleens. In cases where the spleen appeared large on gross examination, microscopic study showed this was due to an increase in size and activity of the lymphoid follicles.

Discussion and Conclusions

I. Rabbits

Although *Aspergillus nidulans* has frequently been referred to as a pathogenic fungus a critical review of the literature indicates that the experimental evidence is inadequate to support this contention. Most of the experiments indicated that the intravenous injection of rabbits with

large doses of conidia would sometimes kill the animal in a few days with multiple abscesses of various organs, especially the kidneys. Little effort was made to distinguish between the growth of the fungus in infarcted tissue and in the development of true progressive lesions with invasion of living tissue by the growing organism. However, the experiments reported here indicate that this organism is pathogenic for rabbits altough the type of lesion produced often differed from those previously described.

The intravenous injection of rabbits with living conidia results in the formation of abscesses in various organs with the most frequent lesions being found in the kidneys. After a minimum period of about ten days the lesions either regress with absorbtion of the purulent material leaving only a small amount of scar tissue to indicate the site of the abscess, or the character of the lesion changes. These changes consist of the formation of epithelioid and giant cells, and a partial walling-off of the lesions by connective tissue with the appearance of lymphocytes in the connective tissue zone. As this process continues the former abscess is converted to a tubercle with a purulent center. Continued development produces typical tubercles; this is especially true of lesions arising from subsequent injections.

After about the same time interval a change in the morphology of the fungus can be observed. In abscesses arising from a primary injection the fungus first grows as mycelium quite similar in appearance to that from cultures. The walls of the hyphae may appear more eosinophilic even in the early stages of the disease. As the lesions progress the hyphae become bent and twisted and the walls appear thicker and more eosinophilic. As this process continues acidophilic, short, close-set, spinous projections appear along the hyphae. Continued development leads to the formation of actinomycetoid bodies with radiating clubs very similar to those seen in true „sulfur granules" except that the clubs are more pointed and the whole structure is smaller in size. Even though the granule is smaller than those seen in actinomycosis the elements of the granule appear coarser and the central portion often shows short hyphae of rather large diameter.

In rabbits receiving multiple injections the appearance of the lesions often indicated whether they developed from the last or from previous injections. Lesions arising from later injections were more common in the lungs than in other tissues. In animals that had received previous injections, actinomycetoid granules often developed directly from germinating conidia with little or no mycelium formation. A few rabbits were injected repeatedly with small doses of living conidia, and when death occurred a few days after an injection actinomycetoid granules could be found scattered throughout the tissues, especially in the lungs, with little or no tissue reaction around them. This would indicate that previous abscess or tubercle formation at the same site is not necessary for the formation of actinomycetoid granules. However, actinomycetoid forms were found only in animals in which tubercle and giant cell formation could be demonstrated.

In all rabbits so tested, a skin test of the tuberculin type could be elicited with cell sap after the time interval in which the lesions changed from the purulent to the granulomatous type and the fungus changed from simple mycelium to the actinomycetoid form.

These experiments would strongly indicate a close relationship

between the appearance of tubercles, the alteration in the morphology of the fungus and the appearance of a tuberculin type skin test. The data do not, however, allow any conclusion to be drawn as to the time relationship between these changes. That is, whether the change in the lesions occurs as a result of the development of hypersensitivity of infection, or whether the hypersensitivity develops as a result of the formation of granulomatous lesions, can not be determined from these experiments. Also, whether the formation of the actinomycetoid structure occurs because of the change to the tubercle type of lesion, or because of the development of the tuberculin type of sensitivity or whether it preceeds one or both of these alterations can not be decided. Previous injection with cell sap did not sensitize the animal so that positive skin tests were produced nor did it seem to have any effect on the disease resulting from the subsequent injection of living conidia.

In rabbits receiving either single or multiple injections of living conidia neurological symptoms were usually produced. These consisted of incoordination of gait, spastic paralysis of the hind legs and in severe cases paralysis of the whole body. No lesions could be found grossly or microscopically in the central nervous system to account for these symptoms. Paralysis was seen in animals that died before the formation of granulomatous tissue, actinomycetoid forms or the development of a positive skin test as well as late in the course of the disease after these changes occurred. Neither heat-killed conidia in large doses, nor large and repeated doses of cell sap produced neurological symptoms. It is suggested that some thermolabile toxic substance is present in the conidia or else is elaborated by the growing organisms and is not present in cell sap in amounts large enough to produce such symptoms. The cell sap does not contain any toxic substance such as is present in the cell sap of *Aspergillus fumigatus* and certain other species of the genus. Rabbits tolerate large and repeated doses of cell sap intravenously if the injections are spaced so as to avoid anaphylactic reactions.

A general view of the pathogenicity of *Aspergillus nidulans* for rabbits would seem to indicate the following sequence of events. The intravenous injection of living conidia produces abscesses in various organs and particularly in the kidneys. The lesions may arise from small capillary infarcts with subsequent growth of the mycelium. As the hyphae continue to extend there is some invasion of contingent normal tissue with a resulting purulent inflammation. The abscesses arising from the process continue to develop for a week or more but eventually start to regress if the animal survives long enough. In some cases the lesion heals completely and is replaced by a small amount of connective tissue. Frequently, after about ten days the abscess undergoes a progressive change of a granulomatous nature which leads to the formation of a tubercle. At about the same time the animal develops a hypersensitivity of the tuberculin type, and the fungus undergoes a morphological change which leads to the formation of an actinomycetoid granule. Later injections may give rise to tubercles and actinomycetoid granules directly. Neurological symptoms frequently appear and are not related to the histology of the lesions.

II. Guinea Pigs

Aspergillus nidulans appears to have little or no pathogenicity for guinea pigs, although intravenous injections were not tried in these animals. Intraperitoneal injections of single, large doses of living conidia

never gave rise to progressive disease. If animals were deliberately sacrificed a relatively mild peritonitis was found, but germination of conidia rarely occurred and no extensive growth of mycelium or invasion of normal tissue could be demonstrated. Sometimes toxic changes could be observed in the liver.

Repeated small doses of conidia injected intraperitoneally into guinea pigs at intervals shorter than three weeks resulted in a progressive decline with eventual death. Even in these animals no growth of the fungus occurred and death seemed to be due to the extensive adhesions resulting from the repeated production of mild peritonitis, although again there was slight evidence of some toxic factor which may have played a rôle.

If guinea pigs received two injections of the living conidia from ½ slant with a time interval of three weeks or more separating the two injections death resulted in twenty-four hours or less. This reaction seems to be identical with that described by NAKAYAMA for *Nocardia asteroides* and differs in several respects from true anaphylaxis. Some type of sensitivity phenomena is indicated, however. The peritonitis resulting from the second injection after such a time interval was much more severe with extreme congestion, edema, and multiple haemorrhages in the omentum and mesentery. Again, germination of conidia and invasion of tissue could not be demonstrated. This reaction is dependent on living conidia; heat-killed conidia will not give the reaction if used for either or both of the two injections. Similarly, cell sap will not sensitize to a subsequent injection of conidia. Cell sap is not primarily toxic for guinea pigs althought it will readily give rise to anaphylactic sensitivity.

Summary

1. *Aspergillus nidulans* is pathogenic for rabbits by intravenous inoculation producing two types of lesions.
2. Purulent inflammation with abscess formation follows the initial injection in rabbits but after an interval of ten days or more the abscesses either regress or show a progressive change of a granulomatous nature. The lesions which follow a primary injection are most common in the kidney.
3. Subsequent injections may give rise directly to tubercles without previous abscess formation, and lesions arising from subsequent injections are more common in the lungs than in other tissues.
4. After approximately the same time interval as that which proceeds the formation of tubercles and granulomatous tissue the rabbits develop a hypersensitivity of the tuberculin type as demonstrated by skin tests with cell sap.
5. Also, after about the same time interval the fungi in the lesions undergo a morphological change which leads to the formation of actinomycetoid granules instead of normal mycelium. Subsequent injections may result in the formation of actinomycetoid granules directly with little or no previous growth of mycelium.
6. In animals with either purulent or granulomatous lesions neurological symptoms are common. These consist of incoordination of the hind legs progressing to spastic paralysis. Neither cell sap nor heat-killed conidia produce such symptoms, and no lesions could be demonstrated in the central nervous system by gross or microscopic examination.

7. The cell sap of *Aspergillus nidulans* is not toxic for rabbits and can be administered in large and repeated doses if they are spaced so as to avoid anaphylactic phenomena. Precipitins are formed as a response to the injection of cell sap.
8. The previous injection of either cell sap or heat-killed conidia does not affect the disease resulting from the subsequent injection of living conidia.
9. *Aspergillus nidulans* appears to have little or no invasive power for guinea pigs as measured by intraperitoneal or subcutaneous injection of living conidia.
10. The intraperitoneal injection of guinea pigs produces a mild, transitory peritonitis with little or no germination of conidia or growth of the fungus.
11. Repeated intraperitoneal injection of guinea pigs with conidia at short intervals leads to a progressive decline and death of the animal, but this apparently results from the formation of extensive adhesions from the repeated attacks of peritonitis. No invasion of the tissue or growth of the fungus can be demonstrated.
12. The intraperitoneal injection of guinea pigs with a moderate dose of living conidia which is repeated after three weeks or more causes death in twenty-four hours from the Nakayama reaction.
13. Neither cell sap nor heat-killed conidia will produce the NAKAYAMA reaction.
14. Cell sap of *Aspergillus nidulans* is not toxic for guinea pigs and can be administered in large and repeated doses if spaced so as to avoid anaphylaxis.

Bibliography.

Dodge, C. W.: Medical Mycology, St. Louis, 1935, C. V. Mosby Co. — Ediam, E.: Beitrag. Biol. Pflanzen, **3**, 1883, p. 392. — Eidam, E.: Rabh. Krypt. Flora Pilze, 2 Aufl. Bd. I, Abt. II P. 62, 1887. — Heider, A.: Cent. f. Bakt., Orig. P. 553, 1890. — Henrici, A. T.: Jr. Immunology, **36**, No. 4, p. 319, 1939. — Hu, C. H., Reiman, H. A. and Kurotchkin, T. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **XXVI** p. 413, 1929. — Lindt, W.: Arch. Exp. Path. Pharm., **21**, p. 284, 1886. — Nakayama, H.: Arch. f. Hyg. **58**, p. 207, 1906. — Nanta, A.: Arch. d. Maladies du Coeur, Jan. 1930. — Nanta, A.: Arch. d. Maladies du Coeur, March 1929. — Nanta, A.: Ann. d'Anatomie Path. **VII**, no. 6, p. 689, 1930. — Neveu-Lemaire, M.: Precis Parasit, p. 101, 1921. — Nicolle, C. & Pinoy, E.: Compt. Red. Acad. Sci. **144**, p. 396, 1907. — Nicolle, C. & Pinoy, E.: Arch. de Parasit. **10**, p. 437, 1906. — Ota, M.: Ann. Parasit. Hum. Comp., **1**, p. 137, 1923. — Pinoy, E. & Masson, P.: Bull. Soc. Path. Exot., **8**, p. 11, 1915. — Pinoy, E. & Nanta, A.: Compt. Rend. Acad. Sci., **184**, p. 347, 1927. — Pinoy, E. & Nanta, A.: Compt. Rend. Soc. de Biol., **97**, p. 67, 1927. — Puestow, K. L.: Arch. Derm. Syph., **20**, p. 642, 1929. — Reiman, H. A., Kurotchkin, T. G. & Tso, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **XXVI**, p. 410, 1929. — Reiman, H. A. & Kurotchkin, T. G.: Am. Jr. Med. Sci. **CLXXXI**, p. 107, 1931. — Siebenman, F.: Monatschrift f. Ohrheil. **23**, p. 73, 1889. — Thom, C. & Church, M.: The Aspergilli, Baltimore, 1926, Williams & Wilkins Co. — Weill, P. E. & Gaudin, L.: Arch. Med. Exp. Anat. Path. **28**, p. 463, 1919.

Arthur Trautwein Henrici
(1889-1943)

by

CHARLES H. DRAKE

(from the Department of Bacteriology and Public Health, State College of Washington, Pullman, Washington)

(25-2-1947)

The field of microbiology lost one of its leading figures by the death of Dr. ARTHUR T. HENRICI on April 23, 1943. An outstanding scientist, learned teacher and gifted artist, Dr. HENRICI made important contributions to a number of fields of microbiology and was well known for his work in several such fields. He was the author of two widely used textbooks, an important monography on morphologic variation and growth rates of bacteria, and numerous scientific articles. His many students will long remember his brilliant lectures, warm friendship and modest manner and will always look upon him as an example after which to pattern their endeavors.

Dr. HENRICI was born March 31, 1889 in Economy, Pennsylvania, U.S.A. He attended public school in Pittsburgh and graduated from the University of Pittsburgh in 1911 with an award for high scholarship and the degree, Doctor of Medicine. After serving a year and a half as pathologist for the St. Francis Hospital, he went to the University of Minnesota in 1913 as Instructor in Pathology and Bacteriology. In 1917 he was advanced to Assistant Professor of Bacteriology and Public Health and in the same year entered the Army of the United States where he served as Captain in the Medical Corps from 1917 to 1919. He returned to the University of Minnesota and in 1920 was made Associate Professor of Bacteriology and Immunology and in 1925 became Professor of Bacteriology.

During the year 1926—1927 Dr. HENRICI was visiting professor at Cornell University and spent a part of 1940—1941 on leave as the Walker Ames Professor at the University of Washington, where he also engaged in a study of marine bacteriology. He was advisory editor of the *Journal of Bacteriology* from 1935 to 1939 and associate editor from 1939 until his death. From 1938 on he was a collaborator of *Mycopathologia.* In 1938 he was elected Vice-President and in 1939 President of the Society of American Bacteriologists. In the latter year he was also Vice-President of a section of the Third International Microbiological Congress.

Dr. HENRICI married Blanche Ressler in 1913 and was the father of three children, Carl Ressler, Ruth Elizabeth and Hazel Jean. He was a devoted father and took great pride and joy in his family. Personally, Dr. HENRICI was modest, quiet, and cheerful with a quick humor and a ready wit. His intellectual and liberal mind was an example for all of his asso-

Arthur Trautwein Henrici
1889—1943

Charles H. Drake

ciates. He devoted much time to the training and encouragement of graduate students and voluntarily conducted an informal weekly discussion group covering the whole realm of microbiology. This was eagerly attended by those working for advanced degrees since it did much to orient specific problems in the broad field of Biology.

Painting and photography were prominent among his several hobbies, and he won considerable distinction in the latter field. He was an avid student of nature and on field trips showed a profound knowledge of natural phenomena outside his chosen field of microbiology. Although his earlier training was predominantly medical he always emphasized the broader biological view in his studies of microorganisms. The scope of his studies embraced: oral and dental bacteriology, mycology, growth rates of bacteria and limnology. Some of his best known works concerned a number of pathogenic actinomycetes. A list of some of his publications is given below.

Index of the Works of Arthur T. Henrici

Degeneration of the nucleus lentiformis, associated with cirrhosis of the liver. *Lancet,* London, 11: 797—799, 1913.

The staining of yeasts by Gram's method. *Jour. Med. Res., 30* : 409—415, 1914.

Report of the mouth infection research (with T. B. Hartzell and H. J. Leonard) *Official Bulletin National Dental Assoc., 1* : 48 : 70, 1914.

A study of Streptococci from Piorrhea alveolaris and from apical abscesses (with T. B. Hartzell) *J. amer. med. Assoc., 64* . 1055—1060, 1915.

The specificity of streptococci. *J. of Infections Dis., 19* : 577—605, 1916.

The specificity of streptococci. *J. National Dental Assoc. 111* : 334—362, 1916.

Renal tumor of the rabbit. (with E. T. Bell) *J. Cancer Res. 1* : 108, 1916.

Renal tumors in the rabbit. (with E. T. Bell) *J. Cancer Res., 1* : 157—167, 1916.

The dental path. Its importance as an avenue of infection. (with T. B. Hartzell) *Surg. Gynec. & Obst., 22* : 18—27, 1916.

The dental path. Its importance as an avenue to infection. *St. Paul Med. J., 18* : 77—86, 1916 (with T. B. Hartzell).

A method for obtaining satisfactory sections of teeth with the soft tissues „in situ". *Internat. Ass. Med. Mus.,* 45—47, 1916.

The microscopic anatomy of chronic periodontitis and the pathogenesis of dental root cysts. (with T. B. Hartzell). *J. National Dent. Assoc., 4* : 1061—1074, 1917.

The pathogenity of mouth streptococci and their role in the etiology of dental diseases. (with T. B. Hartzell). *Ibid, 4* : 477—498, 1917.

The bacteriology of vital pulps. (with Hartzell). *J. Dent. Res., 1* : 463—476, 1919.

The bacteriology of vital pulps (with Hartzell). *J. Nat. Dent. Assoc., 7* : 375—377, 1920.

A microscopic study of pulps from infected teeth (with T. B. Hartzell). *Journal of Dental Research, 2* : 537—50, 1920.

The acidfast actinomycetes (with E. L. Gardner). *Journal of Infectious Diseases, 28* : 232—48, 1921.

A case of pulmonary infection with a new species of acidfast *Actinomyces.* (with E. L. Gardner) *Minnesota Med., 4* : 443—445, 1921.

The Bacteriology of vital pulps (with Hartzell). *Pacific Dental. Gaz., 29 :* 531—535, 1921.

Immunologic studies of actinomycetes, with special reference to the acid-fast species (with E. Nelson). *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 19 :* 251, 1921—22.

A statistical study of the form and growth of a spore-bearing bacillus (preliminary report). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 19* : 132—33, 1922.

Potassium iodide does not influence the course of an experimental actinomycosis (with G. S. Reynolds). *Ibid., 19* : 255—56, 1922.

A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 21* : 215—17, 1923.

Influence of age to parent culture on size of cells of *Bacillus megatherium. Ibid., 21* : 343—45, 1924.

Influence of concentration of nutrients on size of cells of *Bacillus megatherium. Ibid.,* 21 : 345—46, 1924.

Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Ibid., 20* : 293—95, 1923.

A statistical study of the form and growth of a diphteroid bacillus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 20 :* 179—80, 1922.

The rate of spore formation in bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 22* : 197—99, 1924.

On cytomorphosis in bacteria. *Science, 61* : 644—47, 1925.

A statistical study of the form and growth of cholera vibrio. *Journal of Infectious Diseases, 37* : 75—81, 1925.

Morphologic variations of bacteria in the lag phase. *Ibid., 38* : 54—65, 1926.

Involution forms of *Escherichia coli. Journal of Infectious Diseases, 39* : 429—40, 1926.

The occurrence of yeasts in soil (with R. L. Starkey). *Soil Science, 23* : 33—44, 1927.

Morphologic variation and the rate of growth of bacteria. Springfield, III., Charles C. Thomas, 1928. 194 pages.

Morphological variation and the rate of growth of bacteria. *Proceedings of the International Congress of Plant Sciences, 1* : 185, 1929.

Molds, Yeasts and Actinomycetes. New York, Wiley and Sons, 1930, 296 pages.

Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology, 25* : 277—86, 1933.

A pleomorphic organism showing relationships between staphylococci and actinomycetes (with Milan V. Novak). *Journal of Infectious Diseases, 52* : 253—67, 1933.

A study of variation in a chromogenic asporogenous yeast (with Laila Punkari). *Journal of Bacteriology, 26* : 125—38, 1933.

The Biology of Bacteria. Boston, D. C. Heath and Company, 1934, 472 pages.

Stalked bacteria, a new order of Schizomycetes (wih Delia Johnson). *Journal of Bacteriology, 29* : 3, Januari, 1935.

Further studies on spontaneous variations of *Torula pulcherrima* (with Laila Punkari). *Ibid., 29* : 259—67, March. 1935.

Allergic reactions of actinomycetes (with D. R. Mathieson, Ruth Harrison, and Carolyn Hammond). *American Journal of Hygiene, 21* : 405—21, March, 1935.

Studies of freshwater bacteria, II. Stalked bacteria, a new order of Schizomycetes (with Delia E. Johnson). *Journal of Bacteriology, 30* : 61—92, July, 1935.

Precipitin reactions with bone and teeth. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 34* : 343, April, 1936.

Review of C. W. Dodge. *Medical Mycology* in *American Journal of Public Health, 26* : 443, April, 1936.

Studies of freshwater bacteria. III. Quantitative aspects of the direct microscopic method. *Journal of Bacteriology, 32* : 265—80, 1936.

Tests of medical aptitude at Minnesota (with J. W. Cavett and S. B. Lindley). *Journal of the Association of American Medical Colleges, 12* : 257—68, September, 1937.

Review of L. Neipp, *De l'influence de divers cations sur le croit microbien* in *Archives of Pathology, 26* :1276, 1938.

The distribution of heterotrophic bacteria in the bottom deposits of some lakes (wih Elizabeh McCoy). *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters, 31* : 323—61, 1938.

Studies of freshwater bacteria. IV. Seasonal fluctuations of lake bacteria in relation to plankton production. *Journal of Bacteriology, 35*:129—39, Februari, 1938.

Allergy in Monilia and yeast infections (with Cora R. Owen and M. B. Anderson). *Mycopathologia, 1* : 10—25, May, 1938.

The Biology of Bacteria (second edition). Boston, D. C. Heath and Company, 1939. 494 pages.

Studies of freshwater bacteria: V. The distribution of *Siderocapsa treubii* in some lakes and streams (with Yvette Hardman). *Journal of Bacteriology, 37* : 97—104, 1939.

An endotoxin from *Aspergillus fumigatus. Journal of Immunology, 36* : 319—38, 1939.

Experimental trichophytid in guinea pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Melicine, 41* : 349—53, Juni, 1939.

Revision of *Chlamydobacteriales* and *Caulobacteriales.* Pages 881—91 in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore, Williams and Wilkins, 1939.

The distribution of bacteria in lakes. Pages 39—64 in *Problems of Lake Biology.* (Publication No. 10 of the American Association for the Advancement of Science). Lancaster, Pa.: *Science Press,* 1940.

Experimental trichophytid. Pages 567—69, in *Proceedings of the Third International Congress for Microbiology,* 1940.

Characteristics of fungous diseases. *Journal of Bacteriology, 39* : 113—38, February, 1940.

The yeasts: genetics, cytology, variation, classification, and identification. (Review.) *Bacteriological Reviews, 5* : 97—179, 1941.

Review of Jorgen Birkeland, *Microbiology and Man, in Science, 97* : 512—13, June 4, 1943.

Nocardia asteroides: its pathogenicity and allergic properties (with C. H. Drake). *American Review of Tuberculosis, 48* : 184—98, Sept., 1943.

Nomenclature and classification of Actinomycetes (with Selman A. Waksman). *Journal of Bacteriology, 46* : 337—41, October, 1943.

Alexandre Guilliermond

by

O. Verona

(from the Istituto di Microbiologia agraria, Università di Pisa)

(30-1-1947)

One of the most significative figures in the field of Mycology, chiefly renowned because of his researches on yeasts, to the cytology and phylogenesis of which he carried an original and important contribution, left in these years. Prof. A. Guilliermond died.

Professor of the Science Faculty at Paris since 1927, and a Fellow of Academy, he was degreed in Natural Sciences in 1902 and immediately enticed to join the scientific research and, in particular, the botanic studies. „J'ai orienté mes études vers la Botanique, parce que cette partie de la Science me paraissait plus propre à éclairer certains problémes de Biologie générale que l'étude complexe des Animaux.

...„J'avais été frappé par l'intérêt des études cytologiques et par l'utilité qu'on pouvait en retirer pour établir une connaissance plus exacte du développement, de la sexualité et de la taxinomie des Thallophytes. D'autre part, mon attention avait été attirée par la lecture du Traité de Microbiologie de Duclaux sur l'obscurité qui régnait à ce moment sur les affinités systématiques des Levures. C'est dans l'espoir de découvrir des phenoménes sexuels au cours du développement de ces Champignons et par là de résudre le problème toujours ouvert de leur origine, que j'ai entrepris mes premières recherches".

With the referred words he shows by himself how he was attracted by the study of the vegetal biology and, afterwards, of yeasts, whose study he carried on during his entire life, although often joined with other researches of vegetal citology. In the latter studies gave him incentive and directions Prof. Matruchot, and the Pasteur Institute.

Considered in its complex, A. Guilliermond's work concerns the following fundamental groups of researches:

1) — Researches concerning the growing, sexuality and phylogenesis of yeasts.
2) — Studies on the phylogenesis of Ascomycetes and on the higher Ascomycetes.
3) — Researches on the citology of Bacteria and Cyanophyceae.
4) — Studies on the morphological constituents of cytoplasms and on the products of the cellular metabolism (metachromatic bodies, mitochondrial and vacuolar apparatus, evolution of plasts, lipoidic granulations, and so on).

Among all these researches, those on which we wish here to attract the attention are the ones concerning the Yeasts or Blastomycetes, which

interfere, as it is known, in a strong manner into the pathogenesis of a large number of mycosis.

For what concerns the *citology of yeast* the ideas widely followed on their *general structure* before the appearing of the GUILLIERMOND's works were notably unclear. It was questionable, e.g., the problem of nucleus, wich some students supposed typical, but others only under form of diffused granulations. GUILLIERMOND, comparing the citology of Yeasts with that of Mucedinacee *(Dematium, Didium,* and others) showing yeast-like phased, succeeded in the doubtless demonstration of the presence of a typical nucleus. He observed that the structure of yeasts shows, during their development, strong modifications, which appear by means of differences in the chromatic attitude of the nucleus, and above all by the appearing of phases characterised by small and numerous vacuoles followed by others with a single and large vacuole.

He observed besides, in the cytoplasm, the presence of siderophil granulations and of irregular and diffused structures which he named „basophil granules". In particular, afterwards, A. GUILLIERMOND studied in the cytoplasm the evolution, the function and the microchemical characters of the „metachromatic bodies" reaching some conclusions supported afterwards by many authors, among which A. MEYER.

Actually, always for what concerns the general structure of yeasts, A. GUILLIERMOND followed with strict accuracy the cytologic phenomena coupled with the sporulation process.

Another subject which attracted, during a long time, GUILLIERMOND's attention, and for which he was rewarded with the Desmazières Prize, by the Academy of Sciences, concerned the sexuality of yeasts. Indeed the appearing of sexuality in yeasts was already suggested by SCHIÖNNING and HOFFMEISTER; but it is true that GUILLIERMOND was the first who gave a demonstration of it, clearing, in the same time, a number of phenomena coupled with it.

Comprehensively, the GUILLIERMOND's researches on the sexuality of yeasts demonstrate, in a quite clear manner, that the Blastomycetes form one of the most characteristic examples of groups where sexuality is going backward, and where it is possible to observe all the phases conducing to its disappearance.

In fact, a general view on the group of Saccharomycetes leads to a separation of four groups of yeasts, corresponding to the four steps of the regressive evolutions of sexuality. We observe therefore:

1°) — Yeasts maintaining the atavistic isogamic or heterogametic sexual conjugation, by which afterwards the ascus derives its origin.
2°) — Yeasts which have lost the faculty of a sexual conjugation although maintaining traces of „sex-appeal".
3°) — Yeasts which have substituted to the atavistic sexual conjugation a copulation between the ascospores.
4°) — Yeasts, actually, which do not show a sexual attraction.

Since the PASTEUR's time, the problem concerning the *origin of yeasts* has been subject to many brisk controversies, because a few, among whom HANSEN, supposed them to form a group of autonomous fungi, similar to the Oxoaceae, and other students, for instance BREFELD, explained them

as a phase of growth of higher fungi, the perfect form of reproduction of which was yet unknown. The GUILLIERMOND's researches, through which became clear the cytologic phenomena coupled with the sporulation, and the discovery of the most evident facts of sexuality, made possible the comparation of the sporophore of Yeasts with the ascus of Ascomycetes, and therefore the description of the former group as one systemically autonomous.

It was made clear, as a final result, that Yeasts form an autonomous group of Ascomycetes.

A particular interest for the relations afterwards assumed for what concerned the phylogenesis of yeasts, deserved some researches on Endomycetaceae. GUILLIERMOND had already expressed the opinion that the forms most resembling the yeasts should be observed in the family of Endomycetaceae; this family, however, was then very little known. But it happened that Mrs. STOPELL discovered in that time the *„Eremascus fertilis"* and that she gave the description of the isogametic formation of its ascus; and that LINDNER succeeded in the isolation, about the same time, of the *Endomyces fibuliger,* and at last SCHIÖNNING of the *Saccharomycopsis capsularis.*

Repeating in details the cytologic study of these species, it was possible for GUILLIERMOND to establish that they, from a cytological standpoint, do not differ from Yeasts, supporting in that manner the suggestion of their relationship with the Endomycetaceae.

The aforesaid results allowed GUILLIERMOND to establish the phylogenetical scheme of yeasts. Assumed in the *Eremascus* the atavic form, the yeasts could have derived their origin through two different ways, by two hypothetical forms: one of which runs parallel to *Endomyces fibuliger* and brings to the genera *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces,* the other runs close to *Endomyces Magnusii* and explains the origin of the genus *Schizosaccharomyces.*

This scheme, accepted by the greatest number of students, became soon a classic one. It was confirmed by the discovery of new forms, as the *Endomyces Lindneri* and the SAITO's *Endomices Hordei,* the *E. Javanensis* Klöcker, and other species, and it was only developed, but never contradicted in its fundamental principles, as it has been demonstrated by Mrs. STELLING—DEKKER in her careful systemic study.

Mixed with the large quantity of the aforesaid works, it was not lacking the description of newfound genera, e.g. the *Ashbya* genus (1928) and of new species, and other researches concerning some species systemically close to yeasts, as, for instance, *Sporobolomyces.* The last genus, discovered by KLUYVER and VAN NIEL, was attributed, on the basis of some morphological characters, to the Hemibasidia. The characters of their nuclei brought however GUILLIERMOND to the conclusion that *Sporobolomyces* was not a member of the said group of fungi.

At the border of this great work, which illustrates only one among the sides of A. GUILLIERMOND's labour, stay all the researches performed in his laboratory and under his direction by his direct collaborators and assistants and by foreign students. Among all these works a particular attention deserve those performed by GRIGORAKI and PEJU, DA FONSECA, OTA and others, particulary concerning the study of the pathogenic fungi.

After GUILLIERMOND have been named some genera:

— *Guilliermondia* Boudier, genus of Mirangiaceae;

— *Guilliermondia* Nadson and Konokotine, changed afterwards in *Nadsonia* by SIDOW in order to avoid the repetition of the BOUDIER's genus;

— *Guilliermondella* Nadson and Krassilnikov, fallen because of synonymy.

To him have been dedicated also various species, a number of which already retaining their validity:

— *Debaryomyces Guilliermondii* Dekker
— *Hanseniaspora Guilliermondii* Pijper
— *Saccharomyces Guilliermondii* Schweizer
— *Zygosaccharomycodes Guilliermondii* Nishiwaki
— *Candida Guilliermondii* (A. Cast.) Langeron et Guerra.

Doublessly, A. GUILLIERMOND leaves an evidente track, because of his important and original contribution, in the field of the biology of yeasts, which maintain so great importance not only because of their zymotechnical applications, but also because of their interference in the field of the Human and Animal Pathology.

Index of the most significative works concerning biology, cytology and classification of yeasts, performed by prof. A. Guilliermond

1) — Etude sur le développement et la structure de l'*Oidium lactis*. *Rev. Gén. Bot.*, XII, p. 465, 1900.
2) — Recherches histologiques sur la sporulation des Levures. *C. R. Acad. Sc.*, CXXXII, p. 1194, 1901.
3) — Recherches histologiques sur la sporulation des Schizosaccharomycetes. *C. R. Acad. Sc.*, CXXXIII, p. 1252, 1901.
4) — Considerations sur la sexualité de certaines Levures. *C. R. Acad. Sc.*, CXXXIII, 1901.
5) — Recherches cytologiques sur les Levures. *Rev. Gén. Bot.*, XV, p. 49, 1902.
6) — Observations cytologiques sur la germination des spores du *Saccharomyces Ludwigii*. *C. R. Acad. Sc.*, CXXXV, p. 708, 1902.
7) — Remarques sur la copulation de *Schizosaccharomyces mellacei*. *Ann. Soc. Bot. de Lyon*. 1903.
8) — Sur le noyau de la Levure. *Ann. Mycol.*, II, p. 185, 1904.
9) — Recherches sur la germination des spores chez quelques Levures. *C. R. Acad. Sc.*, CXXXIX, p. 988, 1904.
10) — La morphologie et la Cytologie des Levures. *Bull. Inst. Pasteur*, III, p. 19, 1905.
11) — Recherches sur la germination des spores et la conjugaison chez les Levures. *Rev. Gén. Bot.*, XVII, p. 337, 1905.
12) — A propos de l'origine des Levures. *C. S. Soc. Biol.*, LX, p. 316, 1906.
13) — L'origine des Levures. *Ann. Mycol.*, V, p. 50, 1907.
14) — Contribution à l'étude cytologique des *Endomyces: Saccharomycopsis capsularis* et *Endomyces fibuliger*. *C. R. Acad. Sc.*, CXLVII, p. 1329, 1908.

15) — Sur la reproduction sexuelle de l'*Endomyces Magnusii. C. R. Acad. Sc.*, CXLVIII, p. 941, 1909.
16) — Quelques remarques sur l'*Eremascus fertilis* et sur ses rapports avec *l'Endomyces fibuliger. C. R. Soc. Biol.*, LXVI, p. 925, 1909.
17) — Sur la phylogénèse des Levures. *C. R. Soc. Biol.*, LXVI, p. 998, 1909.
18) — Remarques sur la phylogénèse des Levures. A propos des publications récentes de MM. Klöcker et Dombrouski sur les *Endomyces. Centr. f. Bakt.*, XXIV, p. 480, 1909.
19) — Quelques remarques sur la copulation des Levures. *Ann. Mycol.*, VIII, p. 288, 1910.
20) — Nouvelles observations sur la cytologie des Levures. *C. R. Acad. Sc.*, CL, p. 835, 1910.
21) — Remarques sur le développement de l'*Endomyces fibuliger. C. R. Soc. Biol.*, LXVIII, p. 318, 1910.
22) — Sur un curieux exemple de parthénogénèse observé dans une Levure. *C. R. Soc. Biol.*, LXVIII, p. 363, 1910.
23) — Sur la reproduction du *Debaryomyces globosus* et sur quelques phénoménes de rétrogradation de la sexualité observés chez les Levures. *C. R. Acad. Sc.*, CLII, p. 448, 1911.
24) — Sur la régression de la sexualité chez les Levures. *C. R. Soc. Biol.*, LXX, p. 277, 1911.
52) — Sur un exemple de copulation hétérogamique observé chez une Levure. *C. R. Soc. Biol.*, LXX, p. 442, 1911.
26) — Sur une Levure nouvelle isolée des crachats humain au cours d'un cancer secondaire du poumon. *C. R. Soc. Biol.*, LXX, p. 952, 1911.
27) — Die geschlechtliche Vermehrung der Hefepilze. *Mikrokosmos.*, V, p. 101, 1911.
28) — Die Stammesgeschichte der Hefepilze. *Mikrokosmos.*, V, p. 121, 1911.
29) — Nouvelles observations sur la sexualité des Levures: 1° Existence d'une copulation hétérogamique observée dans une espèce nouvelle; 2° Sur la copulation de *Debaryomyces globosus;* 3° Sur les prènoménes de rétrogradation de la sexualité constates dans plusieurs Levures. *Arch. f. Protistenk.*, XXVIII, p. 52, 1912.
30) — Recherches comparatives sur le développement de l'*Endomyces fibuliger* et de l'*Endomyces capsularis,* et nouvelles remarques sur la signification des anastomoses qui se produisent dans l'*Endomyces fibuliger. Livre Jubilaire de VanLaer,* p. 36, 1913.
31) — Monografie des Levures rapportées d'Afrique occidentale par la Mission Chevalier. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, XIX, p. 32, 1914.
32) — Sur un exemple de copulation hétérogamique observé dans une nouvelle Levure, *Lygosaccharomyces Nadsoni. C. R. Soc. Biol.*, LXXVIII, p. 568, 1915.
33) — Sur la division nucléaire des Levures. *Ann. Inst. Pasteur.*, XXXI, p. 100, 1917.
34) — Levaduras del pulques. *Bol. d. Direccion de Estudios biologicos.*, II, p. 22, 1917.
53) — *Zygosaccharomyces Nadsoni:* Nouvelle espèce de Levuures à conjugaison hétérogamique. *Bul. Soc. Mycol. de France, XXXIV, p.* 14, 1918.

36) — Sur un nouveau Champignon présentant des caractères intermédiaires entre les Levures et les *Endomyces*. *C. R. Soc. Biol.*, LXXXII, p. 1343, 1919.
37) — Les Levures des saucissons. *Ann. Inst. Pasteur.*, XXXIV, p. 129, 1920.
38) — Une nouvelle espèce de Levure du genre *Debaryomyces D. Klöckeri*, n.sp. *Bull. Soc. Myc. de France.*, XXXVI, p. 104. 1920.
39) — *Zygosaccharomyces Pastori*, nouvelle espèce de Levure à copulation hétérogamique. *Bul. Soc. Mycol. de France.*, XXXVI, p. 203, 1920.
40) — Une nouvelle espèce de Levure du genre de *Debaryomyces D. Nadsoni*, n.sp., *Bull. Soc. Mycol. de France.*, XXXVII, p. 35, 1921.
41) — Quelques remarques nouvelles sur la cytologie des Levures., *C. R. Soc. Biol.*, LXXXVIII, p. 517, 1923.
42) — Etude d'un Champignon pathogéne du genre *Monilia*. *Ann. Parasit. hum. et Compar.*, V, p. 48, 1927.
43) — Observations cytologiques et taxinomiques sur les Levures du groupe des *Sporobolomyces*. *C. R. Acad. Sc.*, CLXXXIV, p. 617, 1927.
44) — Sur la cytologie des *Nematospora*. *C. R. Acad. Sc.*, CLXXXV, p. 1510, 1927.
45) — Etudes sytologiques et taxinomiques sur les Levures du genre *Sporobolomyces*. *Bull. Soc. Mycol. de France.*, XLIII, p. 245, 1928.
46) — Nouvelles observations sur l'appareil de Golgi: l'appareil de Golgi chez les Levures. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXXVIII, p. 1003, 1929.
47) — Nouvelles observations sur la structure des Levures. *Arch. Microb. Leningrad.*, 1929.
48) — Sur le genre *Zygosaccharomycodes* et quelques points obscurs du développement des Levures. *Travaux Crupt. dediés à L. Mangin*, 1931.
49) — Recherches sur l'homothallisme chez les Levures. *Rev. Gen. Bot.*, XLIII, 1931.
50) — Sur la sexualité des Levures et sur les relations de cees Champignons avec les Exoascées. *C. R. Ac. Sc.*, CCI, p. 1163, 1935.
51) — Nouvelles observations sur le cycle de développement des Levures et considérations sur la phylogénie de ces Champignons. *Rev. Gen. Bot.*, 1936.
52) — La sexualité, le cycle de développement, la phylogéné et la classification des Levures. *Masson*, Paris, 1937.

Treatises

A. GUILLIERMOND — Les Levures. *Doin*, Paris, 1911. (Afterwards translated in english language by Tanner).
Collaborazione a: MARSHALL, Microbiology. *Ed. Churchill*, Londra, 1917.
Tabulae Botanicae in coll. con Blakeslee, Baur e Jahn, published in Berlin, *Borntraeger*, 1913.
A. GUILLIERMOND. Clef dichotomique pour la détermination des Levures. *Le François*, Paris, 1928.
A. GUILLIERMOND, G. MANGENOT, L. PLANTEFOL. Traité de Cytologie végétale. *Le François*, Paris, 1933.
A. GUILLIERMOND et G. MANGENOT. Biologie végétale., *Masson, Paris*, 1937.

Index of the principal researches concerning yeasts and the human mycology, performed in the prof. A. Guilliermond's laboratory

1) — H. Rajat. Le Champignon du Muguet. *Thése de Doct. en Méd,.* Lyon, 1906.
2) — H. Marchand. Sur la conjugaison des ascospores chez quelques Levures. *C. R. Soc. Biol.,* LXII, 1912.
3) — „ Nouveaux cas de conjugaison des ascospores chez les Levures. *C. R. Soc. Biol.,* LXXIII, 1912.
4) — „ La conjugaison des ascospores chez les Levures. *Rev. Gén. Bot.,* XXX, 1918.
5) — G. Mangenot. Sur la formation des asques chez l'*Endomyces Lindneri. C. R. Soc. Biol.,* 1919.
6) — „ Sur la formation des asques chez les *Endomyces. C. R. Soc. Biol.,* 1919.
7) — Grigoraki et Peju. Sur une nouvelle espèce de Levure du genre *Debaryomyces: D. Matruchoti. C. R. Soc. Biol.,* LXXXV, 1921.
8) — „ „ . Etude de quelques espèces nouvelles de Levures isolées de certains exsudats pathologiques de l'homme. *Bull. Soc. Mycol.,* 1922.
9) — „ „ . Quelques espèces nouvelle du genre *Torula. Bull. Soc. Mycol.,* 1922.
10) — „ Les Champignons parasites du syndrome de Beurmann et Gougerot et l'espèce *Rhinocladium Gougeroti. Bull. Soc. Mycol.,* 1924.
11) — „ Contributions à l'étude des Dermatophytes. *C. R. Ac. Sc.,* 1925.
12) — „ Recherches cytologiques et taxinomiques sur les Dermatophytes et quelques autres Champignons parasites. *Ann. Sc. nat. Bot.,* 1925.
13) — Da Fonseca. Sobre os agentes deas Blastomycoses europeas cyclo sexuado e posicao systematico do Lavedo de Hudelo. *Brasil medico,* 1922.
14) — „ Sur une Levure isolée d'une Dermatomycose. *C. R. Soc. Biol.,* 1923.
15) — Ota, M. Cinq espèces de Levures considérées comme pathogénes appartenant au genre *Debariomyces. Arch. de Paras.* 1924.
16) — Papadokis. Sur une copulation hétérogamique observée dans *Willia farinosa. C. R. Soc. Biol.,* 1922.

Mancata formazione di forme ascofore e conservazione di culture di Funghi Patogeni in substrati naturali

di

R. Ciferri e R. Redaelli

(dal Centro di Micologia Umana e Comparata di Pavia-Milano)

(5-2-1947)

Il problema della conservazione in cultura dei funghi patogeni é apparso periodicamente alla ribalta della stampa specializzata, sopratutto per i Dermatofiti, in relazione a quel complesso di degradamenti morfologici e patogenetici che vanno sotto il nome di „pleomorfismo". Crediamo superfluo riferire le varie proposte, volta a volta affacciate, sopratutto in merito alla composizione dei terreni di cultura, dato che nessuno dei substrati artificiali di cultura preposti ha risposto allo scopo, neppure il cosidetto „terreno di conservazione" di Sabouraud, frequentemente usato all'uopo. Però, dall'insieme dei risultati ottenuti dai vari studiosi — e confermati dalla nostra esperienza — é emerso che i terreni più ricchi (in glucidi solubili più ancora che in sostanze proteiche) sono quelli che più facilmente e più rapidamente inducono i fatti pleomorfici.

Un accertamento casuale dell' interesse dei terreni cosidetti „naturali" nella conservazione delle culture di Dermatofiti si é avuto attraverso la ricerca di forme picnidiche ed ascofore di detti funghi.

Qualche anno fa Nannizzi (1926, 1927) coltivando dei Dermatofiti su vari substrati naturali, aveva ottenuta una forma picnidica, che lo aveva autorizzato a classificare questi funghi tra i Gimnoasci imperfetti (Nannizzi, 1931). Con gli stessi mezzi e con risultati analoghi, ma ancor meno completi, avevano lavorato Langeron e Milochevitch (1930). Poteva darsi che, insistendo sulle culture su mezzi naturali per più lungo tempo e sotto diverse condizioni d'ambiente, si giungesse ad ottenere le forme perfette di tali funghi (ascofore).

Per tali ragioni imbastimmo le culture sul cui risultato dell'esame morfologico microscopico riferiamo sommariamente.

TECNICA — I ceppi di Dermatofiti, in parte da noi isolati e in parte ottenuti da altri laboratori, erano stati isolati di recente e si trovavano nella piena molteplicità della loro morfologia; poche forme erano inizialmente pleomorfizzate e solo due molto pleomorfiche.

I mezzi naturali di cultura in cui tali specie furono trapiantate (partendo da culture su ordinario agar pepto-glucosato) furono: penne morbide di gallina; crine di cavallo; frammenti di unghie fresche di cavallo; frammenti di cuoio grezzo conciato; letame bovino fresco; letame bovino maturo; fieno secco misto di Leguminose e Graminacee; fieno-silos fresco; buona terra da giardino (cfr. pure BARTHEL, 1918; GREENE e FRED, 1934).

Tutti i substrati secchi furono immersi per circa 24 ore nell'acqua, e quindi distribuiti in tubi da saggio piuttosto grossi, nel cui fondo vi era della lana di vetro imbevuta d'acqua. La sterilizzazione si effettuò per due ore al giorno e per tre volte a giorni alterni, a 3 atm. di pressione; la sterilità dei tubi fu controllata incubando per 3 giorni a 30° C due tubi per ogni substrato, dopo avervi versato del brodo pepto-glucosato.

I trapianti dei Dermatofiti si effettuarono staccando, a mezzo di un'ansa di platino, dalle culture madri dei frammenti di agar di circa 1 cmq. con il fungo ben sviluppato e deponendolo sul substrato naturale sterile, piuttosto verso il fondo del tubo da saggio.

Dopo aver ricoperto l'estremità dei tubi con della stagnola, in maniera da difendere il cotone di chiusura, le culture furono divise in due lotti, all'incirca uguali, e chiusi in due cassette di zinco, una delle quali fu seppellita nel Giardino botanico, ai piedi di un albero, e l'altra fu deposta in un angolo di una cantina semi-interrata piuttosto umida.

Tutto ciò si effettuò nell'aprile del 1943; nel maggio del 1946 — vale a dire dopo circa 3 anni — il materiale venne ritirato e le culture osservate attentamente al microscopio, onde accertare l'eventuale presenza di forme picnidiche o periteciali. Le colonie erano tutte poco evidenti; su alcuni dei substrati si vedevano dei filamenti piuttosto lassi, quasi ragnatelosi, e qua e là dei piccoli cordoni o dei glomeruli di micelio; altri erano invece, in apparenza, cosparsi di polvere, frammista a dei frammenti di micelio. Le stagnole di copertura erano solo in parte intatte, ma i tappi di cotone, di frequente, più o meno disfatti.

Il successivo esame microscopico avendo accertato che delle forme sospette di essere periteciali o picnidiche, erano, in realtà, dei glomeruli di micelio, si pensò di accertarsi della vitalità delle culture e di studiarne la morfologia sui terreni di cultura ordinari.

All'uopo, spesso con qualche difficoltà, si staccarono dei frammenti delle culture dai substrati solidi che si seminarono sia su agar pepto-glucosato che su agar susina; in qualche caso si fecero pure delle culture in brodo pepto-glucosato.

Le culture furono lasciate sviluppare a temperatura ambiente di laboratorio, e quindi esaminate al microscopio onde indagarne la morfologia. Sarebbe stato interessante osservare, in comparazione, la morfologia degli stessi ceppi trapiantati, durante lo stesso lasso di tempo, sui mezzi usuali di laboratorio; ma le vicende della guerra avevano portato alla perdita delle nostre collezioni di funghi.

RISULTATI OTTENUTI — Nel quadro seguente sono riassunti i risultati ottenuti:

Specie e ceppo; morfologia iniziale (1)	Penne di gallina	Crine di cavallo	Cuoio conciato	Letame fresco	Letame maturo	Fieno secco	Fieno-silos	Terra di giardino		Penne di gallina	Crine di cavallo	Cuoio conciato	Letame fresco	Letame maturo	Fieno secco	Fieno-silos	Terra di giardino
	Conservati nella cantina									Conservati sotterra							
Trichophyton crateriforme N	+ N	+ N	—	+ SP	+ P	+ N	—	+ SP		+ N	+ N	(2)	+ N	+ P	+ N	—	(2)
idem P	+ P	+ P	+ P	+ SP	+ SP	+ SP	—	+ P		+ P	+ P	+ SP	+ P	+ P	+ P	—	+ P
Epydermophyton rubrum N	+ N	+ N	—	—	+ PS	+ N	—	+ SP		+ N	+ N	+ N	—	+ P	+ N	—	+ SP
idem P	+ P	+ P	?	+ SP	+ P	+ P	(2)	+ P		+ P	+ P	?	+ SP	+ P	+ P	—	+ SP
Achorion gypseum N	+ N	?	?	+ N	+ SP	+ P	—	+ SP		+ SP	+ SP	+ N	+ N	+ SP	+ P	—	+ SP
idem P	+ P	+ P	+ SP	?	?	+ N	—	+ P		+ P	+ P	+ SP	+ SP	?	+ SP	—	+ P

(1) — N = ceppo normale; SP = ceppo semi-pleomorfizzato; P = ceppo pleomorfizzato; + = sviluppo del fungo; — = mancato sviluppo del fungo; ? = substrato troppo contaminato.

(2) = tubo spezzato.

Discussione

Se le tre specie di Dermatofiti considerate non hanno prodotto, dopo tre anni di cultura, né forme ascofore né forme picnidiche, si é potuto accertare che tali funghi si conservano viventi nei substrati naturali indagati, per lo più senza pleomorfizzare, anzi, in qualche caso, riprendendo in parte o in tutto, la normale e complessa morfologia di partenza. Fa eccezione il fieno-silos fresco, in cui — forse a causa dell' alta acidità iniziale — non si é avuto mai alcun sviluppo di funghi. Anche il cuoio grezzo conciato si mostrò meno efficace degli altri substrati, forse a causa di una certa difficoltà a mantenersi sufficientemente umido.

Un riassunto dei risultati ottenuti mostra quanto segue:

Per specie

Trichophyton crateriforme:

da una forma N	7	culture	N
	2	„	SP
	2	„	P
da una forma P	0	„	N
	3	„	SP
	10	„	P

Epidermophyton rubrum:

da una forma N	7	culture	N
	2	„	SP
	1	„	P
da una forma P	0	„	N
	3	„	SP
	9	„	P

Achorion gypseum:

da una forma N	4	culture	N
	6	„	SP
	2	„	P
da una forma P	1	„	N
	4	„	SP
	7	„	P

Per substrato

Penne di gallina:

da una forma N	5	culture	N
	1	„	SP
	0	„	P
da una forma P	0	„	N
	0	„	SP
	6	„	P

Crine di cavallo:

da una forma N	4	culture	N
	1	„	SP
	0	„	P
da una forma P	0	„	N
	0	„	SP
	6	„	P

Cuoio grezzo conciato:

da una forma N	2	culture	N
	0	„	SP
	0	„	P
da una forma P	0	„	N
	2	„	SP
	1	„	P

Letame fresco:

da una forma N	3	culture	N
	1	„	SP
	0	„	P
da una forma P	0	„	N
	4	„	SP
	1	„	P

Letame maturo:

da forme N	0	culture	N	da forme N	4 culture N
	3	„	SP		0 „ SP
	3	„	P		2 „ P
da forme P	0	„	N	da forme P	1 „ N
	1	„	SP		2 „ SP
	3	„	P		3 „ P

Fieno secco:

Terra da giardino:

da una forma N	0	culture	N
	5	„	SP
	0	„	P
da una forma P	0	„	N
	1	„	SP
	5	„	P

In riassunto:

Per le tre specie:

da una forma N	18	culture	N
	10	„	SP
	5	„	P
da una forma P	1	„	N
	10	„	SP
	26	„	P

Per i vari substrati:

da una forma N	18	culture	N
	11	„	SP
	5	„	P
da una forma P	1	„	N
	10	„	SP
	25	„	P

Ciò significa che:

1) — le tre specie di Dermatofiti si comportano analogamente sui vari substrati naturali saggiati.
2) — In linea generale le forme normali non hanno tendenza, su tali substrati, a pleomorfizzare; e, inversamente, le forme pleomorfiche, di regola, rimangono tali, ma talvolta riprendono, per lo più, in parte la morfologia originaria; solo eccezionalmente si ha il ripristino di tutta la morfologia originaria.
3) — Per il mantenimento della morfologia completa paiono ottimi, come substrati, le penne di gallina, il fieno secco e il crine di cavallo; mediocremente buono il letame fresco; deficienti il letame maturo e la terra da giardino; da scartare il fienosilos.
4) — Per il ripristino della morfologia originaria da forme pleomorfiche si potrebbe tentare la cultura su fieno secco o su cuoio grezzo conciato od anche su letame fresco ma — a quel che pare dalle nostre esperienze — con poche probabilità di successo.

Riassunto

Il tentativo di ottenere forme picnidiche od ascofore di Dermatofiti, lasciandoli crescere durante 3 anni, all'oscuro (sotto terra e in cantina), su substrati cosidetti naturali (penne di gallina; crine di cavallo; unghie fresche di cavallo; cuoio grezzo conciato; letame bovino fresco e maturo;

fieno secco e fieno-silos; terra da giardino) non ha dato risultati positivi. Si é constatato, però, che nella maggior parte dei substrati e per la maggior parte delle specie, queste rimangono viventi, e da culture normali non vi é tendenza a pleomorfizzare; al contrario, talvolta, si ha un tentativo di ripristino della normale morfologia partendo da culture pleomorfiche.

Summary

The attempt of obtaining pyknidic or ascus-bearing forms of Dermatophytes, letting them grow during a period of three years in the darkness (underground and in cellars) on so-called natural mediums (hen-feathers, horse-hair; fresh horse-hoofs; raw tanned leather; fresh and ripe cattle manure; dried and silos-hay; garden soil) has not given satisfying results.

It has been observed, however, that in the greater part of mediums and for what concerns the greatest part of species, these remain alive, and in the normal cultures there is not tendency towards a pleomorphism; on the contrary, it has been sometimes observed an attempt of regaining the normal morphology in the pleomorphic cultures.

Letteratura citata

BARTHEL H., Centr. f. Bakt., II, 48, 340—349, 1918. — GREENE H. C. and FRED E. B., Ind. Engin. Chem., 26, 1297—1298, 1934. — LANGERON M. et MILOCHEVITCH S., Ann. Parasit. Hum. Comp., 8, 422—436; 465—508, 1930. — NANNIZZI A., Ann. Mycol. 24, 85—129, 1926; R. Accad. Fisiocr. Atti, 29. IV. 1927; Atti Ist. Bot. Univ. Pavia, IV, 2, 103—109, 1931.

Torula morrhuae, another synonim of Sporendonema Epizoum (Corda) Cif. et Red.

by

CIFERRI R. and REDAELLI P.

(from the Centro o Micologia umana e comparate Pavia and Milano)

(10-3-1947)

The species has been described by FARLOW on tegument of salted fishes from U.S.A. as *Oidium pulvinatum* Farl. (Rev. Myc., p. 197, 1885) as *Torula pulvinata* Farl. (Bull. U.S. Fishy. Comm. p. 2, 1886), [non *T. pulvinata* (Bon.) Sacc. (1870), nec (Speg.) Sacc. (1880), nec H. et P. Syd. (1906)] and, at last, as *Oidium morrhuae* Farl. (Bull. l. c., p. 4, 1886). Then by SACCARDO (in TROTTER, Syll. fung., *25,* p. 762. 1931) it has been referred as *Torula morrhuae* (Farl.) Sacc.

Doubtlessly, this species is to be referred to *Sporendonema epizoum* (Cor.) Cif. et Red. (Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, Ser. 4, *5,* p. 145—198, 1934) of which we previously found other 20 synonyms. Of course, this identity is to be presumed also for the fungus that, in the same Sylloge (p. 762) it has been referred as synonym *Torula epizoa* Corda var. *muriae* Kickx. previously quoted by us; and wich identity with *Sporendonema epizoum* has been discussed in the quoted paper.

In the same paper SACCARDO lists, as probable synonym, *Wallemia ichthiophaga* Johan-Olsen, described in Norway, but the original paper is unknown to us.

In conclusion, this is the nomenclature and the synonymy of the species pertaining to the *Sporendonema* Desmaziéres (1827) sensu Oudemans (1885) emend. Ciferri and Redaelli (1934)..

SPORENDONEMA EPIZOUM (Desm.) Cif. et Red. (1934).

= *Torula epizoa* Corda (1829).
= *Oospora ochracea* Corda (1837).
= *Torula sacchari* Corda (1840).
= *Torula epizoa* var. *muriae* Kickx (1847).
= *Sporendonema Sebi* Fries, p.p. (1849).
= *Torula rubescens* Fresenius (1863).
= *Torula rubiginosa* Rivolta (1873).
= *Oidium pulvinatum* Farl. (1885).
= *Torula pulvinata* Farl. (1886) [emend. (Bon.) Socc. (1876), non (Speg.) Sacc. (1880), nec H. et P. Syd. (1906).]
= *Oidium morrhuae* Farl. (1886).

= *Oospora rubescens* Saccardo (1892).
= *Penicillum simplex* Lindner (1901).
= *Catenularia fuliginea* Saito (1904).
= *Hemispora stellata* Vuillemin (1906).
= *Torula saccharina* Heald et Pool (1908).
= *Scopulariopsis simplex* Vuillemin (1911).
= *Oospora d'Agatae* Saccardo (1918).
= *Torula fuliginea* Berkhout (1923).
= *Torula pulchra* Tengwall (1924).
= *Torula morrhuae* (Farl.) Sacc. apud Trotter (1931).
= *Scopulariopsis d'Agatae* (Sacc.) Dodge (1936).
= *Wallemia ichthiophaga* Jon.-Ols. (?)

Incidentally, DODGE (Med. Mycol.; 1935) quoted three times the same species: as *Hemispora stellata* Vuill.; as *Scopulariopsis d'Agatae* (Sacc.) Dodge, and as *Catenularia fuliginea* Saito. Evidently, DODGE has never observed this fungus in culture. We worked on the original strain VUILLERMIN's *Hemispora stellata* and of SACCARDO's *Oospora d'Agatae*, as well as on the strains *Torula sacchari* Corda as identified by Centr. v. Schimm. of Baarn (see CIFERRI, Atti Ist. Bot. Univ. Pavia, IV, 3, 167, 1932; VAN LUYK, Kon. Akad., Wet. Amsterdam, 1928). In spite of DODGE views, CORDA's figures (in Sturm, III, *3*, 97—98, *pl. 45*. 1829) is as related to this fungus as permitted by the mycologycal knowledge of this time.

As to the differences and duplications between *Geotrichum* and allied genera, *Coniotrichum* Bon., *Allonema* Syd. and *Endoconidium* see CIFERRI, REDAELLI, and DOMINICI (Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, V, *3* (2), 123—125, 1943).

Ricerche sul potere fungistatico e fungicida del sangue nelle Dermatomicosi

del

Dottor F. SERRI

(*Dalla Clinica Dermosifilopatica, Università di Pavia*)

(1-9-1946)

M. JESSNER cui spetta il merito di avere ottenuto contemporaneamente all'AMBROSOLI nelle tricofizie profonde la coltura del *Trichophyton* dal sangue circolante, osservò che questo micete, nei riguardi della sua patogenicità verso la cavia, si comportava diversamente dal micete isolato dal focolaio cutaneo, nel senso di una notevole attenuazione del suo potere patogeno.

Uguali reperti di variazione del potere patogeno furono più tardi messi in evidenza da R. HOFFMANN (*Trichophyton* isolati da ghiandole linfatiche), da ARZT e FUCHS (*Microsporon* dal Sangue), da AMBROSOLI, da KARRENBERG (*Trichophyton* dal sangue), da FALCHI (*Trichophyton* isolato dall'essudato nei confronti di *Trichophyton* isolati dal pelo). Quest'ultimo A. ha potuto inoltre dimostrare come le suddette variazioni di indole morfologica e patogenetica fossero transitorie, tanto che, dopo qualche passaggio, venivano a cessare totalmente.

La constatazione di JESSNER e quelle accennate facevano supporre che le dette variazioni fossero legate al contatto del micete con gli umori, coi tessuti e con gli elementi corpuscolati dell'essudato delle lesioni. JESSNER e HOFFMANN (1923) perciò, allo scopo di chiarire il fenomeno, indagarono con ricerche in vitro se il siero dei pazienti esercitasse qualche azione sul micete e con vari accorgimenti di tecnica giunsero alla conclusione che nel siero esistono delle sostanze, presenti più o meno transitoriamente, che influiscono sull'attività vegetativa del micete in coltura, nel senso di rallentarla o addirittura inibirla. Queste sostanze o corpi immuni sono termostabili. Anche PER e BRAUDE (1928) dimostrarono degli anticorpi fungicidi nel sangue di pazienti affetti da dermatomicosi.

BALBI, in un dettagliato lavoro, ha svolto (1933) una serie di ricerche sull'esistenza e importanza dell'anticorpo di JESSNER e HOFFMANN e conclude che esso" può essere presente nel siero dei pazienti affetti da dermatomicosi in via del tutto eccezionale e senza alcun rapporto alla forma clinica, superficiale o profonda, recente o antica, del processo micosico", e ritiene che" l'importanza di questo anticorpo deve essere ritenuta minima per la transitorietà della sua comparsa nel sangue e perchè nell'enorme maggioranza dei casi non si riesce a svelarlo anche impiegando dosi grandissime di siero su un numero molto piccolo di spore". I risultati di questo lavoro condotto con indagini molto minuziose, veniva a confermare l'idea già sostenuta da BLOCH che nelle dermatomicosi il movimento immunitario

sia sostenuto da fattori prevalentemente istiogeni. Idea che però non finisce di convincere, perchè la clinica delle dermatomicosi dimostra con le tricofitidi, favidi, microsporidi, epidermofitidi, col reperto culturale di miceti dal sangue circolante, con le prove sierologiche, una larga partecipazione generale dell'organismo al processo più o meno localizzato in una parte del tegumento.

Sembra a rigor di logica, che l'organismo, nel senso di risposte immunitarie, non debba rimanere inerte quando si sa che il micete è in circolo, che si localizza nelle ghiandole linfatiche, che provoca eruzioni importanti e che permette di svelare uno stato allergico all'intradermoreazione di tricofitina sia essa normale o privata di sostanze proteiche.

Sorge il dubbio che, in rapporto a quanto osservavano JESSNER, HOFFMANN e BALBI, la reazione immunitaria possa essere realmente transitoria o di breve durata, analogamente a quanto è stato osservato per le culture ottenute dal sangue circolante la cui difficoltà è stata messa in rapporto a gittate momentanee del micete nel circolo. Anche il fatto stesso della facile dimostrazione dello stato allergico alla tricofitina, se può interpretarsi come una proprietà assunta dal tegumento come organo a sè capace di reazioni immunitarie strettamente tissurali, non mi pare a sufficienza spiegabile in rapporto ad altri stati allergici che si osservano in malattie ugualmente a sede cutanea, quali tubercolosi, leishmaniosi, piodermiti, ecc. E'dunque verosimilmente ammissibile che lo stato allergico cutaneo verso la tricofitina, più che a dimostrare nelle dermatomicosi l'esistenza di uno stato immunitario puramente istioide, debba invece stare a rappresentare l'espressione di una condizione che rispecchia un duplice meccanesimo locale e umorale, uno e l'altro integrandosi.

AYRES S. Jr. e NELSON P. ANDERSON (1934) in un gruppo di 56 malati affetti da micosi ai piedi, con o senza eruzioni a tipo di epidermofitidi alle mani ed in altre parti del corpo (compresi quattro controlli normali) ripeterono le ricerche di JESSNER e HOFFMANN e di BALBI e giunsero a queste conclusioni:
1) Il siero di individui normali aggiunto nella proporzione dell'8% al terreno di SABOURAUD non inibisce la crescita della cultura. 2) Il siero di individui con epidermofitosi senza epidermofitidi non inibisce abitualmente la crescita. 3) Il siero di individui con infezione contemporanea dei piedi e delle mani non inibisce affatto o solo parzialmente la crescita. 4) Il siero di individui portatori di epidermofitosi dei piedi e di epidermofitidi delle mani di solito inibisce completamente la crescita della cultura, salvo quando il fungo responsabile è una *Monilia*, un *Criptococcus* o una forma pleomorfa di *Epidermophyton*. 5) Il siero di individui affetti da epidermofitosi dei piedi con eczema delle mani, che non è in relazione colla micosi, non inibisce la crescita dei funghi.

LEWIS e HOPPER (1939) come pure PECK, ROSENFELD e GLICK (1940), al contrario di AYRES e ANDERSON, riuscirono a dimostrare solo scarso e non costante potere fungistatico in pazienti con dermatofitidi. PECK, ROSENFELD e GLICK completarono inoltre le loro ricerche con altre osservazioni le cui conclusioni si possono riassumere nelle seguenti:
1) Sia il siero normale che il siero di dermopazienti con positività della reazione alla tricofitina di varia intensità, possiede potere fungistatico. 2) Non si osserva nessun aumento di questo potere nei pazienti che hanno dermatofitidi a paragone dei cosidetti controlli normali. 3) L'inattivazione del siero, portato a 56° per venti minuti, provoca un aumento del

potere fungistatico in sei campioni di siero su un totale di 35 esaminati. 4) Le iniezioni di tricofitina non aumentano il potere fungistatico del siero, oppure in qualche caso lo diminuiscono. 5) Il siero di cavia possiede potere fungistatico. 6) Il liquido di vescicola di dermatofitide non possiede alcun potere fungistatico.

I risultati, spesso discordanti, ottenuti da questi AA. e le considerazioni esposte in precedenza, mi hanno indotto a riprendere lo studio della questione e a svolgere una serie di indagini allo scopo di vedere quale influenza esercitasse il siero di individui affetti da dermatomicosi, con le loro eventual i componenti immunitarie, sui miceti causa delle più comuni affezioni micosiche della cute.

Ho preso quindi in considerazione le più frequenti dermatomicosi quali le Tricofizie e le Microsporie a tipo infiammatorio (follicoliti, „kerion") e la tigna favosa. Ho riservato le mie indagini a questi tipi clinici, perchè nelle prime per l'acuzie del processo e nella tigna favosa per la lunga durata della malattia, era da presumersi più facile la eventualità di reazioni umorali da parte dell'organismo. Di tutti i casi usufruiti era praticata la relativa coltura e eseguita l'intradermoreazione con antigene mono e polivalente.

Nella tecnica delle ricerche, partendo dalle nozioni acquisite dai lavori del BALBI e del JESSNER che le reazioni immunitarie fossero scarse e transitorie, ho seguito il concetto di porre a contatto con l'elemento fungino per tutto il tempo del suo sviluppo il siero in esame il quale, naturalmente, veniva rinnovata tutti i giorni per lo spazio di almeno dieci giorni. Ho allestito delle calture liquide in cui il terreno era costituito da acqua peptonata a pH 7, con aggiunta di quantità variabili di siero del paziente (2 : 1; 2 : 2; 2 : 4; 2 : 8). Nella provetta deponevo sul terreno liquido un frammento di coltura recente. Questa quantità, in certi esperimenti, fu pesata per avere l'idea esatta dell'accrescimento di fronte ai controlli. Per il Microsporon lanosum, che per la sua ricchezza in fusi si presta molto bene ad allestire una sospensione di elementi fungini, ho anche ricorso all'espediente di allestire una sospensione del terreno entro una provetta da centrifuga, che ogni 24 ore veniva centrifugata per il procedimento del cambio del liquido. Ciò allo scopo di vedere se in queste condizioni di coltura in cui gli elementi miceliali erano più a contatto col siero in esame, fosse meglio dimostrabile l'azione inibitriceo eccitante sulla crescita.

Parallelamente, per ragioni ovvie in numero limitato, ho eseguito anche prove su microcolture in vetrini con cellotta, mantenute in una scatola Petri con relativo dispositivo per assicurare un determinato grado di umidità. Questo dispositivo permetteva di osservare da vicino lo svolgersi della cresita e quindi di precisare meglio le possibili influenze di fronte ai controlli.

I ceppi usati sono stati: il Trichophyton gypseum asteroides (T.G.A.), il Microsporon lanosum (M.L.), l'Achorion Schoenleini (A.S.) e l'Achorion Quinqueanum (A.Q.), tutti isolati di recente e presi da forme cutanee a tipo di „kerion" il primo, da follicolite con microsporide il secondo da tigne favose di lunga durata il terzo e il quarto. Questi miceti avevano, in riguardo alle caraxtteristiche di crescita, questi requisiti: il M.L. denotava una crescita non comune e particolarmente rapida (2—3 giorni); il T.G.A. e l' A.Q. davano segni evidenti di vegetazione in 4° giornata; l' A.S. aveva tempo di crescita normale (temp. + 18° C.).

Per tutte le ricerche sono tati eseguiti controlli con siero normale di individuo sano e con semplice acqua peptonata. Nello schema delle ricerche si cimentarono sia sieri omologhi che eterologhi. Nelle tabelle è riportata la crescita dei miceti nel terreno di cultura che veniva valutata nel modo seguente: crescita moderata (+); crescita regolare (++); crescita vivace (+++).

Ancora un cenno va fatto circa il metodo di prelevamento dei sieri: di regola essi erano prelevati dal paziente e digiuno, non trascuravo tuttavia di far prelevamenti nella stessa giornata, in condizioni di acme febbrile e di fatti reattivi generali o locali provocati da tricofitina introdotta a scopo curativo.

I. Gruppo di esperimenti.

A) azione di sieri da casi di tricofizia profonda

I sieri provenivano da quattro casi di follicolite tricofitica agminata a tipo acuto con fenomeni generali febbrili; tricofitina positiva. Micete usato: T.G.A.

Tabella I

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	8	6	10	15
2—1	+	++	++	+++	+++
2—2	+	++	++	+++	+++
2—4	—	—	+	++	++
2—6	—	—	+	+	+
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	++	++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	++	+++	+++

„Kerion" tricofitico alla nuca in bambino di quattro anni. Decorso apirettico; scarsa reazione generale; cura tricofitinica.

Tabella II

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	++	++	+++	+++
2—2	+	++	++	+++	+++
2—4	+	++	++	++	+++
2—6	+	++	++	++	+++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	++	++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	++	+++	+++

„Kerion" tricofitico della barba; prelevamento del siero in stato febbrille dopo iniezione di tricofitina.

Tabella III

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	+++	+++	+++	+++
2—2	+	+++	+++	+++	+++
2—4	+	++	++	+++	+++
2—6	—	++	+++	+++	+++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+++	+++	+++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+++	+++	+++	+++	+++

„Kerion" multipli della barba in regresso, dopo cura fricofitinite.

Tabella IV

DILUIZIONE SIERO 2—6				SIERO NORM.	ACQUA PEPT.
TIPO DEL MICETE	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	5	10	15	10	10
MICROSPORUM L.	+++	+++	+++	+++	+++
TRICOPHITON G.A.	++	++	+++	++	+++
ACHORION Q.	++	++	+++	++	+++
ACHORION S.	—	++	+++	++	++

La lettura dei protocolli riassunti nelle tabelle, che per brevità sono stati riprodotti in numero ristretto, in quantochè i risultati delle esperienze fatte con altri sieri coincidevano, mostrano in linea generale come anche col sistema adottato, non si possa mettere in evidenza alcuna azione inibitrice da parte dei sieri di individui con tricofizie profonde, sia su miceti del genere dei *Trichophyton* che *Microsporum*, e *Achorion*. Si possono invece fare delle osservazioni sulla maggiore o minore rapidità della crescita in rapporto allo stadio di acuzie della forma morbosa, alla con-

centrazione del siero impiegato ed al tipo di terapia usata (specifica o no) ed al modo di reagire a questa.

Nel caso riferito nella tabella I, si è notato come a concentrazione crescente di siero, si osservava un rallentamento alla crescita nei confronti delle concentrazioni più basse, influenza che si mantenne regolarmente per tutto il periodo della osservazione senza però giungere mai ad inibirla. Viceversa nel caso contemplato nella Tab. II e nella Tab. III abbiamo osservato un comportamento opposto, tanto da doversi affermare che si ottennero a parità di tempo colonie rigogliose come nei controlli su sieri normali e acqua peptonata. La stranezza del reperto mi ha fatto ripetere l'esperienza ed i risultati furono identici.

Cimentando il siero usato per l'esperienza della Tab. I con altri miceti, quali il T. G. A., M. L., A. Q., A. S., e tenendo come diluizione media (2—6), ho potuto rilevare come nessuna influenza venga esercitata sulla crescita dei miceti, sia come tempo, aspetto, colore e morfologia della cultura.

Considerati questi risultati, nel dubbio che il sistema usato di porre a contatto una particella di cultura con la miscela siero— acqua peptonata, potesse far si che solo parzialmente gli elementi fungini avessero subito l'influenza del siero, ho pensato di porre più intimamente a contatto il micete con la miscela, preparando una sospensione, previa triturazione in mortaio e filtraggio su carta da filtro ad alta porosità (controllo microscopico del filtrato). Una goccia di questa sospensione veniva immessa in tubo da centrifuga con le solite miscele di siero e terreno liquido. Ogni 24 ore, per 4 giorni, la provetta era centrifugata ed il liquido sostituito con nuovo siero fresco. Non appena si accennava la crescita del micete, il liquido veniva sostituito mediante a spirazione con siringa. Inoltre le provette erano ogni giorno a varie riprese sottoposte a scuotimento in agitatore per 5', onde assicurare un omogeneo contatto degli elementi fungini col liquido.

TAB. V (siero Tab. I)

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	+	+	++	++
2—2	—	+	+	+	+
2—4	—	—	+	+	+
2—6	—	—	+	+	+
CONTROLLO SIERO NORMALE 2--2	+	++	++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	++	+++	+++

TAB. VI (siero Tab. II)

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	+	++	++	+++
2—2	—	+	+	++	++
2—4	—	+	+	+	++
2—6	—	+	+	+	+
CONTROLLLO SIERO NORMALE 2—2	+	+	++	++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	+	++	++	+++

In realtà abbiamo potuto rilevare con questo dispositivo dei reperti che nel tempo e nella diluizione sono un po' differenti da quelli ottenuti con l'altro sistema per eguale provenienza del siero e per uguale micete. In altri termini, si nota come sia più evidente una reale azione rallentatrice nella crescita della cultura, la quale per le concentrazioni più alte di siero tarda a verificarsi e, stabilitasi, procede molto lentamente e non permette mai di raggiungere le dimensioni osservate nei controlli (siero normale, acqua peptonata). Si noti che le manualità della centrifugazione e delle agitazioni giornaliere dei tubi non costituiscono coefficenti che danneggino la vitalità degli elementi fungini in quanto ne fanno fede perfetta i controlli

Nel complesso possiamo dire che con questo dispositivo di tecnica si può mettere in evidenza un certo potere rallentatore del siero sulla vitalità del micete. Quesito da porsi è se si tratti di azione a tipo immunitario (sostanze anticorpo simili) o al fatto che il micete non trovi un terreno adatto alla sua crescita come substrato nutritizio, escluse condizioni ambientali di reazione, in quanto si parte da pH 7. Il fatto che la crescita si ha ottima e florida su terreno con siero normale fa escludere la seconda ipotesi e rende più verosimile la prima. Ma su questo punto ora accennato, ritorneremo in seguito dopo esaminate le altre ricerche.

II Gruppo di esperimenti.

B) Sieri provenienti da individui affetti da microsporie a tipo infiammatorio (follicoliti diffuse o agminate del capillizio).

Tre casi osservati in bambini di età variante dagli otto ai dieci anni. In uno si ebbe la comparsa di una microsporide con reperto del Microsporon Audouini dal sangue circolante. Il micete impiegato fu il M.L., isolato da una forma infiammatoria, dotato di alta patogenicità per gli animali e di attività di crescita rapidissima tanto che il periodo di osservazione andava ridotto e limitato a 10 giorni, epoca in cui le colonie erano floride normalmente.

Tabella VII

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE			
	2	5	8	10
2—2	++	+++	+++	+++
2—4	+	++	+++	+++
2—6	+	++	+++	+++
2—8	+	++	+++	+++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	+++	+++

Follicoliti diffuse del capillizio. Tricofitina positiva; decorso subfebbrile; cura con topici.

Tabella VIII

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	++	++	+++	+++
2—2	—	++	++	++	++
2—4	—	++	++	++	+++
2—6	+	++	++	++	+++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	++	++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	++	+++	+++

„Kerion" microsporico multiplo al capillizio. Tricofitina intensamente positiva; decorso febbrile. Cura locale e generale con tricofitina.

Tabella IX

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	6	8	10	15
2—1	+	++	++	+++	+++
2—2	+	++	+++	+++	+++
2—4	+	+++	+++	+++	+++
2—6	+	++	+++	+++	+++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	++	+++	+++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	+	++	+++	+++	+++

„Kerion" multipli molto estesi con formazione di focolai colliquativi. Microsporide da M. Audouini dal sangue circolante.

Tabella X

DILUIZIONE SIERO 2—4				SIERO NORM.	ACQUA PEPTON.
TIPO DEL MICETE	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	5	10	15	10	10
MICROSPORUM L.	+	++	+++	++	+++
TRICOPHITON G.A.	+	++	++	++	+++
ACHORION Q.	+	+++	+++	+++	+++
ACHORION S.	—	++	++	++	++

Nel corso della Microsporia otteniamo risultati che in linea di massima s'accordano con quanto è stato osservato nelle tricofizie profonde e cioè che il siero di individui affetti da focolai profondi di natura microsporica

non esercita azione inibente sul micete cimentato, tutto al più svolge, come nella tabella ottava, una breve azione rallentatrice iniziale che però presto si attenua. E' interessante invece osservare come nelle esperienze di cui alla tabellaa IX, che si riferisce ad individuo affetto da quento si può desiderare di più altamente patologico in materia di micosi ("Kerion,, , tricofitide, micete dal sangue circolante), il siero presentava, anche prelevato a varie riprese durante l'acme della forma, la facoltà di facilitare in modo sorprendente lo sviluppo e la crescita rigogliosa del micete. Anche in questo campo sono state eseguite esperienze col sistema della sospensione di elementi fungini nella miscela siero-terreno in provetta da centrifuga, inpiegando i sieri di cui alle tabelle VIII e IX. I risultati ottenuti non hanno permesso di osservare alcuna azione inibente; col siero VIII si è avuta un'azione rallentatrice specie nelle concentrazioni alte (2/6), e con il siero IX una conferma a quanto notato circa l'azione favorevole alla crescita del micete. Nel cimentare sieri con vari miceti non si ottennero risultati degni di nota.

III Gruppo di esperimenti.

C) Azione di sieri provenienti da affetti di „Tigna favosa".

Casi di individui giovani in cui la malattia, molto estesa e grave, durava da vari anni; intradermoreazione alla tricofitina in genere debolmente positiva anche con concentrazioni notevoli (1 : 15); più intensa alla „favina" per quanto non nettamente positiva. Micete impiegato: A.S. da coltura di due mesi. Tempo di osservazione della coltura 20 giorni; concentrazioni usate fino a 2 : 6.

Tabella XI

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	8	10	15	20
2—1	—	—	+	++	++
2—4	—	—	+	++	++
2—6	—	—	+	+	+
2—8	—	—	—	—	+
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	—	+	+	++	++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	—	+	+	++	++

Giovane di 14 anni; favo scutulare in atto con vaste cicatrici.

Tabella XII

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	8	10	15	20
2—1	—	—	+	+	++
2—4	—	—	—	+	++
2—6	—	—	—	+	++
2—8	—	—	—	+	+
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	—	+	++	++	+++
CONTROLLO ACQUA PEPTONATA	—	+	++	++	+++

Giovane di 18 anni malato di tigna favosa da 10 anni; onicomicosi, focolai anche nelle parti glabre.

Tabella XIII

DILUIZIONE SIERO	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	4	8	10	15	20
2—1	—	—	+	+	++
2—4	—	—	+	+	++
2—6	—	—	+	+	++
2—8	—	—	—	+	++
CONTROLLO SIERO NORMALE 2—2	+	+	++	++	++
CONTROLLO SOL. FISIOLOGICA	+	+	++	++	++

Grave favo scutuare con adenopatie; condizioni generali scadenti.

Tabella XIV (siero in diluizione 2 : 6).

SIERO FAVOSO TAB. XII				SIERO NORM.	ACQUA PEPTON.
TIPO DEL MICETE	GIORNI DI OSSERVAZIONE				
	5	15	20	15	15
MICROSPORUM L.	++	+++	+++	+++	+++
ACHORION Q.	+	++	++	+++	+++
ACHORION S.	—	++	++	++	++
TRICOPHITON	—	+	+	++	+++

Nell'esame dei risultati, tenuto conto della lentezza con cui l'A.S. si sviluppa, si deve tuttavia rilevare come il siero svolga realmente un'azione rallentatrice sullo sviluppo della colonia fungina, la quale non raggiunge, specialmente nelle alte concentrazioni, l'aspetto e il volume del controllo in siero normale e tanto meno in acqua peptonata. Identica azione rallentatrice della crescita si osserva nei confronti degli altri miceti, quali il *Microsporon, l'Achorion Quinqueanum* e il *Trichophyton.*

IV Gruppo di esperimenti.

Sutter, allo scopo di dimostrare la presenza nelle dermatomicosi di corpi immuni „in vivo", provocava con congelamento una flittena che, svuotata, era riempita di tricofitina la quale dopo vario tempo veniva usata per le prove di reazione cutanea, senza che si osservasse una varazione nell'attività antigene.

Seguendo questa traccia, ho provocato in vicinanza dei focolai cutanei di tricofizia profonda, di microsporia e di tigna favosa, una bolla con cerotto cantaridato. Pur essendo nelle vicinanze, avevo cura di scegliere zone che erano sicuramente esenti dalla presenza del micete, cosa del resto facile nelle forme profonde e circoscritte; dopo accurata toilette della parte e antisepsi con impacchi di alcole etere, provocavo la bolla; il liquido, aspirato con ago sottile dopo accurata asepsi, centrifugato, serviva per le colture, addizionato d'un terzo di acqua peptonata. Logicamente per la difficoltà di ottenere grandi quantità di liquido di bolla, ho usato anzitutto tubi molto piccoli da sierodiagnosi e il cambio del liquido si è potute effettuare solo per quattro giorni.

Con questo dispositivo ho cimentato il T.G.A., il M.L., l'A.S. e l'A.Q. Devo dire che nessuna osservazione è stata degna di nota in quanto nessuna azione rallentatrice o inibente si è potuto osservare.

Dall'esame riassuntivo di queste ricerche. la prima constatazione che risalta è che, nel siero di individui affetti da dermatomicosi a tipo infiammatorio e da Tigna Favosa, non è possibile dimostrare in vitro, almeno col sistema seguito, un'azione inibitrice sullo sviluppo di miceti omologhi o eterologhi. Tuttalpiù si può ammettere che discontinuamente è possibile

osservare invece un'influenza rallentatrice nel senso che la crescita inizia più tardi, procede più lentamente, la colonia è meno rigogliosa e caratteristica di quanto si osserva nei controlli di siero normale e nell'acqua peptonata.

Interessante il notare come talora in casi che dovrebbero far prevedere il risultato opposto (Tab. IX — II — III), è nettamente visibile un'azione stimolante che permette di ottenere, più rapidamente dei controlli, culture rigogliose.

I risultati che ho ottenuto sono stati osservati su un numero piuttosto esteso di esperienze (complessivamente 40 casi) di cui per brevità ho riportato gli esempi più tipici, in quantochè, tenuto conto delle premesse a questa nota, frequentemente rimanevo titubante davanti a quanto si notava nel corso della ricerca e perciò ripetevo spesso le medesime esperienze onde essere perfettamente sicuro e al riparo da ogni dubbio e rilievo.

Quindi, in rapporto alle mie costatazioni, devo concludere con la conferma delle richerche del BALBI e cioè che l'asserita esistenza nelle dermatomicosi d'una sostanza a valore completo di anticorpo, quale quello definito dalle ricerche di JESSNER e HOFFMANN, non è confermabile; è possibile invece la dimostrazione di azioni rallentatrici che però vanno considerate con molta riserva in quanto riferibili a cause male identificabili ed incerte.

Se la dimostrazione di sostanze ad azione immunitaria nel sangue circolante è per ora, col metodo seguito, fallita, bisogna anche dire che la formazione di anticorpi di natura istioide non è nemmeno molto probativa.

La tecnica seguita della bolla provocata in vicinanza della lesione per cui in seguito allo stimolo si ha il passaggio di plasma attraverso tutti gli strati della cute dove verosimilmente, scondo i sostenitori della natura istioide dell'immunità nelle micosi, avrebbe luogo la formazione di anticorpi, avrebbe dovuto darci un liquido presumibilmente ricco di sostanza a valore di anticorpo. Viceversa anche in casi di cui l'allergia alla tricofitina in vicinanza del focolaio era presente intensa, ciò non è stato possibile dimostrare.

Quindi dobbiamo ritenere che con i metodi seguiti se non è possibile stabilire l'esistenza dell'anticorpo di JESSNER e HOFFMANN è altrettanto non dimostrabile una formazione di anticorpi nella cute stessa.

Quest'ultima affermazione sarebbe in contrasto con l'anticorpo di MARTENSTEIN il quale, come è noto, stabilì che siero ed estratto di pelle di cavia in allergia verso l'A. Q. contengono una sostanza specifica termostabile la quale posta a contatto di elementi miceliali o di fruttificazione di A. Q. dà luogo alla comparsa di una sostanza tossica termolabile. Questa sostanza iniettata nella cavia sana provoca una lesione infiammatoria molto più intensa di quella determinata da un controllo di siero normale + micete. Essa inoltre darebbe anche luogo ad un abbreviamento e ad una attenuazione delle lesioni che seguono all'inoculazione di A. Q. come si osserva per numerose inoculazioni nello stesso animale. Resta a vedere se questi interessanti reperti possibili ad ottenersi nella cavia mentre manche rebbero nell'uome (JESSNER) siane reahnente sufficienti a dimostrare l'esistenza di veri anticorpi nella cute e nel siero di animali in stato di allergia.

Nella prima delle osservazioni di MARTENSTEIN per spiegare il fatto si possono presentare varie ipotesi. Anzitutto si deve considerare l'evenienza che il siero provochi una sensibilizzazione delle cellule verso il micete

contemporaneamente iniettato sia per azione diretta sia per liberazione dalle cellule di sostanze istamino-simili, oppure si possa trattare d'una fase eccitatoria sull'attività germinativa dei funghi nel senso di uno stimolo su di essi. Non è poi da esludere che il siero e l'estratto di cute di cavia portatrice di micosi sperimentale possa agire sulle cellule del tessuto dell'animale nuovo aumentando la permeabilità cellulare e il potere di diffusione degli elementi miceliali. Tutte spiegazioni plausibili mostranti vari meccanismi che possono dare la interpretazione del fenomeno osservato senza ricorrere alla qualifica di anticorpo alle sostanza di MARTENSTEIN. Anche per il secondo fatto messo in evidenza da questo A., che è da ritenersi di reale natura immunitaria, non pare necessario ricorrere alla nozione di corpo tossico termolabile poichè la miscela iniettata può benissimo assumere il significato di antigene nel vero senso della parola in quanto che l'aggiunta di siero o di estratto di pelle di cavia con micosi può conferire al micete iniettato proprietà di antigene.

Se con la tecnica usata non è stata possibile una chiara dimostrazione di sostanze col valore di anticorpi, tuttavia non abbiamo potuto escludere che nei sieri esaminati si possano avere effetti inibitori o rallentatori della crescita del micete; non è assolutamente precisabile se essi siano di breve durata, in quanto facilmente si esauriscono, oppure perchè gli elementi fungini acquistano un potere di resistenza in seguito al contatto prolungato col siero, sebbene le prove fatte con brevi contatti le possano fare escludere.

Tuttavia, acquisiti questi rilievi, che lasciano ancora aperta la questione delle reazioni immunitarie umorali nelle dermatomicosi, mi è parso opportuno vedere in parallelo come si comportasse il potere battericida o fungicida del sangue di questi pazienti.

E' infatti sperimentalmente dimostrato che il sangue, il plasma sanguigno ed anche il siero fresco di animali sani hanno la proprietà di attenuare lo sviluppo dei germi, ed in condizioni opportune, di inibirli e di scioglierli (VERATTI).

Non sono state ancora isolate le sostanze alle quali si deve attribuire questa azione battericida del sangue; esse comunque vengano chiamate alessine o sostanze salvatrici di BUCHNER e considerate entità definite soltanto per comodità di linguaggio.

Questo potere microbicida varia però entro limiti piuttosto ampi nelle diverse specie animali, nei diversi individui e riguardo alle diverse specie microbiche per cuit, mentre vi sono germi che vengono immediatamente sciolti da certi sieri, altri restano del tutto inalterati.

Si è visto inoltre che, come succede nell'animale artificialmente preparato per la produzione di un siero agglutinante antitifo (LUSENA), così nell'uomo malato di tifo si ha coll'iniziarsi dei sintomi morbosi, una caduta del potere battericida, mentre invece compaiono ed aumentano gli anticorpi agglutinanti e litici; si osserva cioè esistere un rapporto indiretto tra questo potere e la pressenza di anticorpi nel sangue: nella convalescenza infatti si ristabilisce gradatamente il potere battericida e diminuiscono al contrario gli anticorpi.

L'azione microbicida del siero normale si esaurisce fine a scomparire in breve tempo specie se esso viene lasciato esposto alla luce; scompare poi definitivamente col riscaldamento a 55° C. per cui le alessine vengono considerate sestanze termolabili legate cioè all'azione del complemento. Dalle ricerche di EHRLICH, MORGENROTH, e di BORDET risulterebbe anzi che il

potere battericida dei sieri normali non è dovuto soltanto all'alessina termolabile, ma all'azione combinata dell'alessina con sostanze sensibilizzatrici termostabili.

Si può pertanto ritenere che tra il così detto anticorpo di JESSNER e HOFFMANN ed il potere battericida del sangue non vi sia alcun legame quantunque le tecniche usate per metterli in evidenza mostrino delle evidenti analogie. Mentre il primo infatti è indipendente dall'azione del complemento e dal tempo di osservazione, il secondo è strettamente legato a questa sostanza ed è presente solo nel sangue, plasma o sieri freschi.

BALBI nell'accennato lavoro ha svolto ricerche analoghe alle mie, con esito però nel complesso tale da ritenere che il potere battericida nelle micosi superficiali sia di scarsa importanza e comunque uguale a quello dei sieri controllo e che nelle profonde ci sia una certa caduta per quanto non costante.

Per la tecnica mi sono tenuto alle note richerche di LUSENA, naturalmente modificandole in rapporto alla logica considerazione della profonda diversità che esiste tra una batteriemia tifosa e una tricofizia profonda, anche se si ottiene il micete dal sangue circolante o si dimostra che debba esistervi sperimentalmente.

He usato sangue citratato (una goccia di sol. di citrato di sodio al 20 % per cc. di sangue): con una sospensione di elementi miceliali o di fruttificazione (un frammento di cultura triturata in mortaio e sospesa in dieci-quindici cc. di sol. fisiologica al 0.8 %) preparavo la miscela di partenza nella proporzione di 1/10 di cc. per cc. di sangue (in genere 2 cc.) e di qui facevo le diluizioni trasportando di tubo in tubo cc. 0.30 secondo la tecnica analoga a quella in uso nella prova del liquor allioro colloidale. (BALBI).

Sospensione spore	2/10 di cc.						
Sangue citratato	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	ecc.
	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	

Con questa tecnica potevo ridurre progressivamente di tubo in tubo il numero dei miceti e metterli a contatto con quantità di sangue senza dubbio capaci di inibirli.

La miscela citrato e sangue fu fatta rapidamente in materiale portato a 37° e si tennero a soggiornare le miscele sangue-micete nel termostato fino al momento del passaggio sul terreno solido di SABOURAUD.

Gli insemenzamenti, praticati con una grossa ansa dell'ampiezza di circa 0,4 × 0,6 cm. furono in genere eseguiti, dopo agitazione, subito dopo fatta la miscela, dopo 30' e dopo 2, 6, 12, e 24 ore. Il micete usato fu per tutte le prove un T.G.A., a crescita molto vivace, recentemente coltivato da una follicolite agminata acuta della barba. In parallelo furono eseguiti controlli con sangue normale e con soluzione fisiologica e alcune volte fu usato oltre il sangue citratato anche siero fresco raccolto nel più breve tempo e mantenuto sempre in termostato. I tubi seminati furono tenuti sempre a temperatura di + 20° C.

Usando questa tecnica ho potuto studiare il comportamento del potere fungicita del sangue „in toto" e del siero fresco negli individui normali, prima e dopo il trattamento con tricofitina e nei portatori di tricofizia infiammatoria a diverso grado di acuzie, con o senza tricofitide, prima e dopo trattamento con tricofitina (complessivamente 45 casi).

Per brevità riassumo nella tabella seguente, solo alcuni dei risultati ottenuti considerando anche il fatto che essi hanno per lo più coinciso in tutti i gruppi di esperimenti. Faccio notare che nella lettura della tabella i raffronti devono essere fatti solo tra i singoli sieri di un determinato gruppo, in quanto, pur usando sempre scrupolosamente la stessa tecnica, logicamente vi poteva essere una sia pur minima variazione della quantità degli elementi fungini che, per ogni gruppo di esperimenti, veniva impiegata nella preparazione della sospensione sporulare. Le numerazioni progressive (1), (2), (3), ecc. stanno a significare i tempi di insemenzamento.

Tabella XV

GRUPPO	NOME	Diagnosi / Tempi di insemenzamento	TUBO: DILUIZ. PROGRESSIVA 1	2	3	4	5	6	7
1	S.R.	Kerion multiplo cuoio capelluto							
		Subito (1)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 2 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 13 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	—	—
	B.A.	Sangue controllo: piodermite e flebite guarita							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	—	—
		(4)	+	+	+	+	+	—	—
		(5)	+	+	+	+	+	—	—
		Controllo sol. Fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
2	S.M.	Tricofizia torpida acutizzata dopo Röntgen. Tricofitide.							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 2 ore (2)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 12 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	—	—
	R.M.	Tricofizia torpida acutizzata dopo Röntgen.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	—	—
		(4)	+	+	+	+	+	+	—
		(5)	+	+	+	+	+	—	—

Segue TAB. XV.

GRUPPO	NOME	Diagnosi Tempi di insemenzamento	TUBO: DILUIZ. PROGRESSIVA						
			1	2	3	4	5	6	7
2	M.B.	Sangue contr.: Eczema areola mammaria in guarigione.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	—	—
		(5)	+	+	+	+	+	+	—
		CONTROLLO soluzione fisiologica.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
3	P.P.	Tricofizia infiammatoria barba e collo.							
		Dopo 15' (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 2 ore (2)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 13 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	+	—
	B.B.	Sano							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	+	—
		(3)	+	+	+	+	+	—	—
		(4)	+	+	+	+	+	+	—
		(5)	+	+	+	+	+	+	—
		Controllo Sol. fisiologica.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
4	P.P. (lo stesso del 3° gruppo)	Tricofizia infiamm. della barba. Dopo tricofitina. (cc. 2,5 in 10 di)							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 3 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 12 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	—	—
	R.M.	Tricofizia infiammatoria della barba.							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	—	—
		(5)	+	+	+	+	+	+	—

Segue TAB. XV.

GRUPPO	NOME	Diagnosi Tempi di insemenzamento	TUBO: DILUIZ. PROGRESSIVA 1	2	3	4	5	6	7
4	O.L.	Sano.							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	—	—
		(5)	+	+	+	+	+	+	—
		Controllo soluzione fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(5)	+	+	+	+	+	—	—
5	M.S.	Tricofizia infiammatoria, cuoio capelluto							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 3 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 12 ore (4)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	—	—
		Controllo soluzione fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(5)	+	+	+	+	+	+	—
6	G.A.	Sana, sangue citratato							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 3 ore (2)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 12 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 24 ore (5)	+	+	+	+	+	+	—
		Sana, siero fresco							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	+	—
		(5)	+	+	+	+	+	—	—
		Controllo sol. fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
			+	+	+	+	+	—	—
7	T.A.	Tricofizia infiammatoria barba.							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	—	—	—
		Dopo 3 ore (2)	+	+	+	+	—	+	—
		Dopo 9 ore (3)	+	+	+	+	—	+	—
		Dopo 26 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—

Segue TAB. XV.

GRUPPO	NOME	Diagnosi Tempi di insemenzamento	TUBO: DILUIZ. PROGRESSIVA						
			1	2	3	4	5	6	7
7		Controllo soluzione fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	—	—	+	+	—
8	M.V.	Tricofizia infiammatoria barba.							
		Dopo 3 ore (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 5 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 18 ore (3)	+	+	+	+	+	+	—
	F.M.	Sana							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(2)	+	+	+	+	+	+	—
		(3)	+	+	+	+	+	—	—
	G.A.	Sana del 6° gruppo. Dopo trattam. prolungato con Tricofitina.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(2)	+	+	+	+	+	—	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		Controllo soluzione fisiologica.							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
9	P.M.	Tricofizia infiammatoria barba.							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 3 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	+	—
		Dopo 24 ore (4)	+	+	+	+	+	—	—
	M.P.	Sano.							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	+	+	—
		(3)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	+	—
		Controllo soluzione fisiologica							
		(1)	+	+	+	+	+	+	—
		(4)	+	+	+	+	+	+	—

Segue TAB. XV

GRUPPO	NOME	Diagnosi Tempi di insemenzamento	TUBO: DILUIZ. PROGRESSIVA 1	2	3	4	5	6	7
10	P.A.	Tricofizia infiammatoria barba.							
		Dopo 30' (1)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 2 ore (2)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 6 ore (3)	+	+	+	+	+	—	—
		Dopo 18 ore (4)	+	+	+	+	+	+	—
	B.P.	Sano.							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(2)	+	+	+	+	—	+	—
		(3)	+	+	+	+	+	—	—
		(4)	+	+	+	+	—	—	—
		Controllo soluzione fisiologica.							
		(1)	+	+	+	+	+	—	—
		(4)	+	+	+	+	+	—	—

Dall'esame della tabella XV risulta anzitutto che in ogni caso esaminato il potere fungicida del sangue è stato sempre pressochè nullo e cioè sia negli individui normali che nei tricofitci non è stato possibile mettere in evidenza con la tecnica usata un reale potere inibitore del sangue o del siero fresco sui miceti corrispondente al cosidetto potere battericida dimostrato per altri germi, nè tanto meno quindi eventuali variazioni di esso. E puesto indipendentemente si può dire dal periode di evoluzione del processo morboso, dalla diluizione delle spore nel sangue, e dal tempo di insemenzamento su terreno di SABOURAUD. Non possiamo infatti attribuire valore probativo ad alcuni reperti di sterilità della cultura che si avevano unicamente ad altissime diluizioni ed in pochi casi; anzitutto perchè anche nei controlli con sol. fisiologica si osservava ogni tanto la stessa cosa, ed infine perchè con la tecnica usata ed a così alte diluizioni di spore era logico pensare che spesso con una ansata non fosse possibile raccogliere alcun elemento miceliale.

A conferma invece delle mie precedenti ricerche sul potere fungistatico si è potuto notare come a medie ed alte diluizioni e prolungando i tempi di osservazione delle culture (in genere dopo 4 — 6 — 10 — 15 giorni) la crescita delle colonie fungine fosse talora meno rigogliosa quando il micete era stato a contatto col sangue di tricofitici, specie se con tricofitide, nei confronti di quelle che si ottenevano da miceti cimentati con sangue normale e con soluzione fisiologica.

Dobbiamo pertanto concludere, al lume delle ricerche eseguite che nessuna importanza può essere attribuita al potere battericida o fungicida del sangue quale fattore difensivo nelle dermatomicosi; e di ciò possiamo

in parte renderci conto se teniamo presente la grande differenza di resistenza di fronte agli agenti fisici, chimici e biologici, che vi è tra le spore dei miceti e di batteri non sporigeni. Al contrario, mentre non è confermabile l'asserita esistenza nelle dermatomicosi di una sostanza a valore completo di anticorpo quale è quello definito dalle ricerche di Jessner e Hoffmann, è possibile invece la dimostrazione di azioni rallentatrici o fungistatiche che però vanno considerate con molta riserva in quanto dipendenti da fattori incerti e non bene identificabili.

Devesi pertanto ritenere che nelle dermatomicosi, il processo di difesa risieda essenzialmente nella cute pur dovendosi considerare dimostrati anche movimenti umorali, quantunque essi siano transitoriamente presenti e di natura difficilmente precisabile.

AUTORIASSUNTO. — L'A. espone una serie di ricerche fatte allo scopo di confermare o meno la presenza di anticorpi liberi in circolo o nei tessuti, nonchè l'esistenza e le variazioni del potere battericida o fungicida nel sangue di individui normali e di individui affetti da dermatomicosi. Conclude che:

1°) nel siero di individui affetti da micosi a tipo infiammatorio e da tigna favosa, non è possibile dimostrare in vitro un'azione inibitrice sullo sviluppo di miceti omologhi ed eterologhi. Tuttalpiù si può ammettere che discontinuamente si osserva una influenza rallentatrice o fungistatica non legata ad una sostanza con vera funzione di anticorpo ma riferibile a cause incerte e male identificabili.

2°) il liquido di bolla provocata in vicinanza di focolai di tricofizia infiammatoria non rivela alcun potere fungistatico; non è pertanto da ritenersi dimostrarata neppure nella cute la presenza di anticorpi o di sostanze con funzione di anticorpi.

3°) sia negli individui normali che nei tricofitici non è possibile mettere in evidenza un reale potere inibitore del sangue o del siero fresco sui miceti corrispondente al cosi detto potere battericida dimostrato per altri germi.

RESUME. — L'A. expose une série de recherches concernantes la présence d'anticorps libres dans le sérum ou dans les tissus, l'existence et les variations du pouvoir bactéricide ou fungicide dans le sang des sujets soit normaux soit atteints de dermatomycoses. Il conclue que:

1°) dans le sérum des sujets atteints de mycose de nature inflammatoire et de Favus on ne peut pas démontrer in-vitro une action inibitrice sur le développement des mycètes homologues et hétérologues. Tout au plus on peut admettre quelques fois une influence freinatrice qui n'est pas liée à une substance avec una véritable fonction d'anticorps, mais qu'on peut rapporter à causes incertaines et pas bien indentifiables.

2°) Le liquide des bulles provoquées en proximité des foyers de Tricophytie inflammatoire, ne montre aucun pouvoir fungistatique. Il ne semble pas possible de prouver même dans la peau la présence d'anticorps ou de substances avec fonction d'anticorps.

3°) Chez les individus normaux comme les tricophytiques il apparaît impossible démontrer un véritable pouvoir d'inhibition du sang et du sérum frais sur les mycètes, qui correspond au soi-disant pouvoir bactéricide qu'on a démontré pour d'autres germes.

ZUSAMMENFASSUNG. — Der V. beschreibt eine ganze Untersu-

chungsreihe, zwegs Bestätigung einer eventuellen Anwesenheit freien, im Blutkreise oder Gewebe, vorhandenen Antikörper, als auch die Existenz und Verschiedenheit des bakteriziden oder pilzabtötenden Blutvermögen, gesunden und an Dermatomykose Erkrankten, angestellt. Der V. schliesst:

1°) Im Blutserum, von an entzündlichen Dermatomykose und Favus Erkrankten, ist keine entwicklungshemmende Wirkung über gleich- und ungleichartigen Pilzen, in vitro erweisbar. Jedoch könnte man, eine unregelmässig zu beobachtende, inhibitorische und auf Pilze wachstumshemmende Beeinflussing, die nicht auf ein rein antikörperfunzionierende Substanz, sondern auf ungewisse und schlecht identifizierende Ursache gebunden wäre, annehmen.

2°) Der Inhalt der, in Nachbarschaft der entzündlichen Tricophytieherden gelegten Blasen, zeigt keinerlei, auf Pilze wachstumshemmendes Vermögen; es ist also auch kein Vorhandensein von Antikörper oder antiköperfunzionierende Stoffe im cutis als festgestellt zu betrachten.

3°) In Gesunden als auch, in den an tiefen Tricophytie Erkrankten Personen, ist keine wirckliches Blut- oder Serumvermögen, uber auf s. g. bakterizides Vermögen entsprechende Pilze, festzustellen.

SUMMARY. — The A. exposes some researches concerning the presence of antibodies in blood serum or in skin and the existence and variations of bactericidal or fungicidal power in blood of normal persons and of patients with fungous infections. He concludes that:

1°) In blood serum of patients with inflammatory micotic infections or with favus, it is not possible to make evident in vitro an absolute inhibition of growth of fungi of the same or different genus. At the most it is possible to admit that sometimes we observe a fungistatic action which is not connected to a substance with true function of antibody but it is referable to uncertain and not well identified causes.

2°) Vesicle fluid obtained from vesicles provoked in proximity of foci of inflammatory tricophytosis reveals no fungistatic power; therefore not even in the skin, it is demonstrated the preence of antibodies or substances with function of antibodies.

3°) In normal persons and in patients with fungous infections it is not possible to make evident a true inhibition of blood or fresh serum on the fungi, correspondent to so called bactericidal power demonstrated for other bacteria.

Bibliografia

AYRES Jr. and HOPPER, Archiv. of Dermat., **29**, 537, 1914.
BALBI, Boll. Istit. Sier. Milan., 515, 1933.
BALBI, Boll. Sez. Reg. Soc. Ital. Dermat., **4**, 249, 1932.
BLOCH, Die allgemeine-patologische Bedeutung der Dermatomycosen (Marhold, Halle, 1913).
BLOCH, Allgemeine u. exper. Biologie der Dermatomykosen, in Hand. der Haut u. Gesch., VI, 1933.
BLUMENTHAL—HAUPT, Dermat. Zeitschr., **36**, 313, 1922.
BUSCHKE u. MICHAEL, Zbt. f. Haut u. Gesch., Bd. 3, 472, 1922.
CAPPELLI, Lo Sperimentale, 1912.
CANTARUTTI, Boll. Ist. Sier. Milan, XII, 1929.
CARMINATI, Boll. Ist. Sier. Milan, XI, 1929.
CETTAN et FIESSINGER, Presse Médic, 75, 1928.

DI GIORGIO A., Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Biolog., II, 1933.
ENGWER, Berl. Klin. Woch., 803, 1921.
FALCHI, Boll. Soc. Med. Chir. Pavia, 3, 1926.
FALCHI, Boll. Soc. Med. Chir. Pavia, 5, 1926.
JADASSOHN W., Arch. f. Dermat. Bd. 153, 476, 1927.
JADASSOHN W., SCHAAF, SULZBERGER, Klin. Woch., 857, 1932.
JESSNER e HOFFMANN, Klin. Woch., 1959, 1923.
JESSNER e HOFFMANN, Arch. f. Dermat. Bd. 145, 187, 1923.
LEWIS and HOPPER, cit. da Peck, Rosenfeld e Glick.
LUSENA, Lo Sperimentale, 1926.
LUSENA, Boll. Istit. Sier. Milan, 704, 1929.
LUSENA, Boll. Istit. Sier. Milan, 634, 1931.
MARTENSTEIN, Arch. f. Dermat. Bd. 131, 180, 1921 e Bd. 142, 279, 1923.
NATHAN, Dermat. Woch. Bd. 71, 439.
PECORI, Sulla immunità nella tricofizia. Roma, 1914.
PECK, ROSENFELD and GLICK, Arch. of Dermat., 42, 426, 1940.
PEDUZZI, Boll. Istit. Sier. Milan., 1932.
PEYER, Wien. Klin. Woch. No. 5, 1926.
PER e BRAUDE, Acta Dermato-Vener. IX, 1, 1928.
RADAELI A., Giorn. It. di Dermat., 612, 1925.
SAEVES, Arch. f. Dermat. Bd. 121, 161, 1916.
SCHIAPPARELLI, Boll. Istit. Sier. Milan., 749, 1932.
SUTTER, Dermat. Zeitschr., Bd. 24, 1917.
SUTTER, Arch. f. Dermat., Bd. 127, 135, 1919.
TRUFFI G. e BENETAZZO G., Boll. Sez. Riun. Soc. It. Dermat., 1930.

Ricerche sul decorso delle infezioni sperimentali da Dermtatofiti in rapporto a un eventuale stato di iperrecettivita' provocata

del

Dott. Luigi Farina

(dalla Clinica Dermatologica, Università di Pavia)

(1-9 1946)

L'esposizione di quanto abbiamo potuto mettere in evidenza nelle ricerche da noi compiute e le relative interpretazioni dei risultati ottenuti, esige che sia prima brevemente accennato quanto é noto sul quadro normale delle lesioni che si osservano negli uguali animali da esperimento (cavia), in seguito alla inoculazione e reinoculazione di dermatofi (*Achorion quinqueanum, Trichophyton gypseum asteroides, Microsporon lanosum).*

Nell'esposizione che faremo ai fini accennati é necessario fissare bene quali siano i quadri di patologia cutanea che insorgono nell'animale in seguito a una prima inoculazione e quelli che seguono invece la reinoculazione.

1) Effetti della prima inoculazione di *Achorion quinqueanum.*

Colture di 20—30 giorni, non pleomorfiche; scarificazioni superficiali della pelle mediante vaccino-stilo oppure abrasioni con carta vetrata. Animale tipo: cavia; incubazione 4—6 giorni; comparsa di una forma circoscritta; lieve arrossamento più accentuato attorno al pelo; scutulini follicolari che confluiscono presto a formare ammassi squammo-crostosi; aumento dell'eritema; essudazione (10—12 gironi circa). Sotto la crosta abrasioni; diradatura dei peli. Al 14° giorno si inizia il regresso della fenomenologia acuta; segue caduta delle squammo-croste. Si scopre una superficie eritematosa integra; il processo infiammatorio si attenua. Desquammazione a piccole squamme; guarigione in 20—22° giorno; alopecia temporanea. Micete sotto forma di miceli abbondanti fino al 10—12° giorno; poi diminuzione del reperto e scomparsa; scarso interessamento dei peli.

2) Effetti della prima inoculazione di *Trichophyton gypseum.*

Animale tipo: cavia; modalità di inoculazione, come sopra; colture di 20—30 giorni di età, non pleomorfizzate. Incubazione della lesione 6—8 giorni; comparsa di elementi eritematosi peripilari che rapidamente confluiscono e si ricoprono di squamma. Edema, infiltrazione su tutta la chiazza. Al 12—15° giorno compaiono croste sieroematiche che candono al 17—18° giorno lasciando una superficie glabra infiltrata, desquammante. Rapida decrescenza dei fatti infiammatori; guarigione completa al 25° giorno; alopecia seguita da ricrescimento dei peli.

Micete presente nelle squamma nei primi 5—6 giorni; al 10° giorno invasione del pelo („endo-ectotrix").

3) Effetti della prima inoculazione di *Microsporon lanosum.*

Animale tipo: cavia; modalità di inoculazione come sopra. Culture di 10—15 giorni, non pleomorfiche.

Incubazione di 7—10 giorni, poi si inizia una forma eritematosquamosa; acme al 17—18° giorni con presenza di elementi vescicolosi infiltrati; guarigione al 45—50° giorno; alopecia seguita da lenta ricrescita.

Micete molto abbondante nelle squamme. Scarsa invasione del pelo.

Nel delineare ora quanto é oggi acquisito sull'aspetto clinico delle lesioni cutanee provocate dalla reinoculazione per via epicutanea dell'animale da esperimento, occorre premettere che ci si riferisce sempre all'apporto di materiale infettante eseguito dopo la guarigione della prima inoculazione: apporto che può avvenire nella stessa sede della lesione già guarita oppure su un qunalsiasi punto del tegumento normale. Di regola la reinoculazione é fatta con dermatofita omologo. Esistono però anche dati su reinoculazioni eseguite con ceppi eterologhi.

1) Reinoculazione con ceppo omologo:

a) *Achorion quinqueanum.*

Animale tipo. cavia; scarificazione provocata con vaccino-stilo o abrasione con carta vetrata. Culture recenti. Zona di cute usuale. Dopo 24 ore reazione infiammatoria a tipo eritematoso. Non scutuli. Lesioni eritemato-squamo-crostose. Acme al 4—5° giorno. Segue essudazione di breve durata. Risoluzione in 8—9° giorno. Raro il reperto di miceti.

b) *Tricophyton gypseum asteroides.*

Animale tipo: cavia. Tecnica di inoculazione come sopra. Dopo 12—24 ore arrossamento infiammatorio, edema. Rapida accentuazione di questi fatti (3—4° giorno); lesione a tipo eritemato-vesciciloso; squammo-croste. Infiltrazione spiccata; 8—10° giorno regressione rapida e guarigione. Scarso il reperto di elementi fungini.

c) *Microsporon lanosum.*

Animale tipo: cavia; tecnica di inoculazione come sopra. Dopo 18—20 ore violenta reazione locale a tipo eritemato-vescicoloso. Infiltrazione ed elementi squammo-crostosi. Ace in 8° giorno; in 12° giorno risoluzione.

Dal confronto di quanto si osserva clinicamente ed istologicamente, appare chiaro come sia diverso il quadro della lesione da prima inoculazione da quello di seconda inoculazione.

Quanto si osserva nell'animale tipo da esperimento, che è la cavia, è sovrapponibile a quanto si è rilevato eseguendo identiche ricerche nell'uomo, sia nel senso di provocarvi una prima e una seconda inoculazione, sia invece eseguendo quest'ultima in individui che avevano superato una forma di micosi infiammatoria da *Achorion Quinqueanum, Tricophyton gypseum, Microsporon lanosum.*

Queste differenze sono reali e realizzabili come e quando si vuole. Sorvolando per ragioni di brevità sull'esposizione teorica di quanto si è indagato per chiarire questi fatti, possiamo senz-altro dire che la diversità tra i due quadri è legata strettamente al fatto che dopo la prima inoculazione sia nel tessuto (la cute) che nell'organismo, si svolgono e si affermano delle modificazioni importanti di indole cellulare ed umorale che si riassumono nella nozione dello stabilirsi di una nuova condizione che rientra nel quadro dei fenomeni immunitari del tipo allergico. In altri termini, l'individuo o l'animale da esperimento cavia) che hassuperato una micosi da *Tricophyton, Achorion, Microsporon,* sia essa spontanea o provocata artificialmente, ha i suoi tessuti di rivestiment in condizioni tali che, davanti ad una seconda inoculazone omologa ad eterologa esso reagisce in modo particolare in quento la prima inoculazione e la prima lesione affermatasi hanno provocato lo stabilirsi di uno stato allergico.

Questo stato allergico, cioè questa modificata reattività cutanea e umorale, non solo si rivelano impriment o un aspetto particolare alla lesione da seconda inoculazione omologa o eterologa, ma si possono mettere in evidenza anche con un'altra modalità di tecnica.

Se noi introduciamo per via intradermica in un animale o in un individuo che non ha mai avuto affezioni cutanee da miceti delle specie accennate *(Tricophyton, Achorion Quinqueanum, Microsporon lanosum)* un'antigene, la tricofitina, non osserviamo in loro nessun fatto reattivo degno di nota; se invece questa indagine è eseguita in animali o in individui che hanno superato o presentano all'acme lesioni provocate dagli accennati miceti, si osserva nel punto di introduzione una reazione a tipo eritemato-papulo-nodoso che sta a dimostrare l'esistenza di un particolare stato di reattività all'antigene che è anch'esso espressione dello stato allergico instauratosi.

Questo stato allergico acquisito naturalmente può assumere valori e intensità variate in dipendenza di fattori noti o ignoti (virulenza del micete, intensità costituzionale del soggetto, tempo decorso della guarigione del processo primitivo, vicinanza o lontananza dal punto di introduzione dell'antigene del focolaio in atto o guarito).

Più precisamente nel concetto attuale del significato da dare a queste variazioni di intensità dello stato allergico noi oggi possiamo fare delle precisazioni che però non hanno alcun carattere ne significato definitivi.

Nella definizione dell'allergia comprendiamo dunque quel complesso di reazioni patologiche dei tessuti e degli umori legate alla introduzione di un antigene e che sono la risultante dell'incontro tra questi e l'anticorpo.

Delineata così una definizione dello stato allergico, davanti a quanto la clinica ci mostra nel corso della pratica applicazione di queste nozioni, possiamo dividere le reazioni allergiche, in iperergiche, ipoergiche, anergiche.

Nella iperergia e ipoergia siamo davanti ad uno stato di ipersensibilità; nell'anergia può trattarsi o di una condizione che è vicina o addirittura identificabile con l'immunità (anergia positiva di JADASSHON), oppure si è davanti alla vera e propria scomparsa di ogni potere difensivo (anergia negativa).

La conoscenza e lo studio di queste acquisizioni assumono notevole significato nella patologia cutanea da miceti perchè certamente esse hanno una influenza importantissima sul decorso, sull-entità della lesione in atto e sulla susseguente condizione immunitaria dei tessuti e degli umori che vengono a stabilirsi verso il declino della lesione e dopo la sua guarigione.

Apre molti problemi, pone molti quesiti che affrontati potranno dare notevoli schiarimenti su punti non ancora chiari di patologia delle micosi cutanee.

Partendo dalla constatazione che in clinica noi abbiamo quadri patologici di lesioni infiammatorie (follicoliti, „kerion Celsi." granulomi) provocate dai soliti dermatomiceti *(Tricophyton, Microsporon)* per le quali non è stato mai possibile una riproduzione sperimentale nell'animale e nell'uomo, abbiamo voluto vedere se con particolari accorgimenti di tecnica si potesse portare un contributo ad un cosi importante argomento.

Sono state svolte perciò le seguenti indagini:

1°) Inoculazioni ripetute tutti i giorni sullo stesso punto del tegumento della cavia, sia precedute da un traumatismo lieve e superficiale che su cute integra.

2°) Inoculazioni ripetute di miscela di miceti in soluzione fisiologica sottocute nella stessa zona del tegumento.

3°) Reinoculazioni crociate od omologhe ripetute per molti giorni con i vari miceti in animali già inoculati per via epicutanea.

4°) Inoculazioni in animali pretattati con iniezioni sottocute di tricofitina.

Tecnica

Inoculazioni eseguite previo traumatismo superficiale della pelle (dorso) con ago o con carta vetrata.

Emulsione in soluzione fisiologica in mortaio sterile di materiale fungino proveniente da culture recenti di Tricophyton gypseum asteroides, Achorion Quinqueanum, Microsporon lanosum.

Animale immobilizzato fino ad essiccamento del materiale inoculato. Esami per la ricerca del micete nel focolaio eseguiti a giorni alterni. Nell'acme della lesione, fotografia e biopsia: naturalmente riservando un secondo animale per il necessario proseguo dell'indagine.

Per ogni serie di ricerca é stoto tenuto un terzo animale per servire quale controllo del descorso normale della lesione micosica provovata.

Primo gruppo

A) Inoculazione in cavia di *Trichophyton gypseum asteroides* ripetute tutti i giorni sullo stesso punto.

B) Iniculazione di *Achorion Quinqueanum* come in A.

C) Inoculazione di *Microsporon lanosum* come in A e B.

A

Cavia n° 19 — Inoculata per 14 giorni di seguito con Trich. gyp. ast.; lesione in atto al 14° giorno a tipo di placca eritemato-crostosa molto infiltrata; reperto positivo per i miceti in 14° giornata nelle squamme. Guarigione in 25° giornata.

Cavia n° 1 — Inoculata per 23 giorni di seguito, lesione in atto molto vivace, assai infiltrata, essudante, coperta da squammo-croste. Reperto positivo per i funghi nei peli e nelle squamme. Guarigione in 32^ giornata. Tricofitina lievemente positiva.

Cavia n° 11 — Inoculata per 18 giorni di seguito; a quest-epoca l'animale muore; lesione infiammatoria acuta, molte squammo-croste; infiltrazione notevole; miceti nelle squamme en ei peli (al 17° giorno).

Cavia n° 15 — Inoculazione per 30 giorni di seguito. Fatti infiammatori molto intensi con un acme al 17° giorno, poi regressione; seguitando le inoculazioni in 22^ giornata ripresa dei fatti infiammatori con acme in 27^ giornata. Guarigione in 45^ giornata. Reperto positivo nelle squamme e nei peli in 19^ giornata. Nelle sole squamme in 27^ giornata.

Cavia n° 2 (controllo) — Inoculazione il 9-1-1940. Ace della lesione in 13^ giornata; guarigione in 20^ giornata.

Cavia n° 36 — Inoculazione di Achorion Quinqueanum eseguita per 15 giorni di seguito interrotta per morte dell'animale. In 15^ giornata lesione eritemato-squamosa infiltrata. Positivo il reperto dei funghi nelle squamme.

Cavia n° 16 — Inoculazione di Achorion Quinqueanum per 21 giorni di seguito. Lesione in atto al 20° giorno piuttosto vivace. Fatti eritemato-vescicolosi, squammo-croste. Risoluzione in 31^ giornata; reperto positivo di miceti in 25^ giornata.

Cavia n° 18 — Inoculazione di Achorion Quinqueanum per 29 giorni di seguito. Precede macerazione della cute con acqua. Acme della lesione al 12° giorno; permane però lesione eritemato-squammosa al 22° giorno; guarigione al 33° giorno. Reperto positivo di miceti in 19^ giornata.

Cavia n° 33 — Inoculazione di Microsporon Lanosum. In 12^ giornata lesione eritemato-squammosa. Risoluzione in 17^ giornata.

Dall'esame dei reperti osservati nei vari gruppi di animali sottoposti ad inoculazioni multiple, di fronte ai controlli si rileva come nei primi sia col *Tricophyton gypseum asteroides,* con *l'Achorion Quinqueanum,* con il *Microsporon lanosum* si sia potuto osservare lo stabilirsi di una lesione che ha presentato caratteristiche speciali e cioé una non comune estensione del focolaio provocato, acuzie note vole del processo, decorso caratterizzato da un acme affermatosi in generale verso il 16—18° giorno, seguito da lieve regresso dei fatti infiammatori e successiva ripresa di tutta la sintomatologia acuta. Reperto dei miceti nelle squamme e nei peli duraturo e dimostrabile a lungo. Complesso di rilievi ben evidenti e nettamente diversi dal quadro usualmente noto per un'unica inoculazione.

Secondo gruppo

Cavia n° 9 — Al 3° giorno dalla inoculazione si nota la presenza di un nodo che aumenta man mano di volume. Da questa nodosità si ha in 4^ giornata la fuoriuscita spontanea di essudato purulento. Si proseguono le inoculazioni alla periferia del punto rammollito la sospensione fungina. Dopo la 6^ inoculazione si procede inoculando a giorni alterni e dopo 17^ ogni 5° giorno. Man mano che si avanza nella serie delle inoculazioni la reazioni diminiusce, finché verso la 19^ giornata si rileva l'esistenza di una nodosità molto consistente e tipo fibroso.

Cavia n° 10 (controllo) — In 5^ giornata dopo la unica inoculazione si apprezza un noduletto che in 9^ giornata dà esito ad una gocciolina di essudato purulento. In 15^ giornata risoluzione dell'infiltrato e guarigione.

Con questo tipo di inoculazione si é potuto osservare netta differenza tra la lesione provocata dalle ripetute inoculazioni e quella da unica inoculazione.

Nel primo caso si é potuto produrre una vasta zona di infiltrazione con netta tendenza alla colliquazione: ad ogni introduzione di materiale fungino si osserva l'accentuarsi dei fatti suppurativi. Verso la fine delle inoculazioni la reazione dimostravasi molto intensa immediatamente, mentre il fattore colliquazione si andava attenuando notevolmente ed era manifesta la tendenza ad uno stato di fibrosclerosi circoscritta.

Terzo gruppo

Cavia n° 01 — Ha ricevuto 23 inoculazioni di micete. In 33^ giornata, dopo perfetta guarigione, della lesione si iniziano le reinoculazioni quotidiane in zona di cute sana previa abrasione. In 5^ giornata arrossamento molto vivace. Acme della lesione in 12^ giornata con fatti infiammetori molto acuti e notevole infiltrazione. In 14^ giornata si inizia il regresso della forma. Si sospendono le inoculazioni. In 27^ giornata guarigione. Reperto positivo del micete in 10^ giornata.

Cavia n° 019 — Ha rivecuto 14 inoculazione per via epicutanea. In 26^ giornata guarigione. Dopo 20 giorni si iniziano le reinoculazioni che sono eseguite in numero di 11. In 19^ giornata acme della lesione, in 12△ giornata accenno a declino. Reperto positivo dei in 11^ giornata.

Cavia n° 022 — Ha ricevuto 4 inoculazioni epicutanee. Lesione guarita in 21^ giornata; riposo di 8 giorni, quindi inizio delle reinoculazioni; in 4^ giornata chiazza eritematosa; acme al 9° giorno. Guarigione in 20^ giornata. Reperto positivo dei miceti in 9^ giornata.

L'osservazione degli esiti di queste reinoculazioni omologhe ripetute per vari giorni na mostrato come la reazione immediata sia piuttosto tardiva (4—6° giornata) e che col susseguirsi dell'apporto di materiale infettante si abbia un intensificarsi delle reazioni piuttosto che un affievolirsi. L'intensità. della reazione e l'entità del focolaio insorto sono più vivaci negli animali che, nei riguardi delle prime inoculazioni, hanno ricevuto numerosi apporti di micete infettante.

B) Reinoculazioni omologhe di Achorion Quinqueanum

Cavia n° 016 — Ha ricevuto 22 inoculazioni del micete; guarigione in 30ô giornata. Si iniziano le reinoculazioni in 31ô giornata. In 4ô giornata lieve arrossamento, in 8ô accentuazione dei fenomeni infiammatori; in 11ô declino della lesione, in 12ô giornata cessano le reinoculazioni. In 20ô guarigione.

Anche nelle reinoculazioni di *Achorion Quinqueanum* si rilevano reperti simili a quelli del gruppo precedente. Come differenza esiste un più rapido instituirsi di lesioni infiammatorie che raggiungono presto l'acme per attenuarsi precocemente.

Reinoculazioni crociate.

A): Reinoculazioni crociate: Tricophyton gypseum asteroides (prima); Achorion Quinqueanum (dopo).

Cavia n° 015 — Ha ricevuto 30 inoculazioni giornaliere di Tric. gyps. ast. Dopo 20 giorni dalla guarigione si procede alla reinoculazione di Ach. Quinq. che sono eseguite in numero di 10. In 7△ giornata lesione a tipo eritematosquammoso con qualche formazione crostosa. Risoluzione in 18^ giornata. Reperto positivo di miceti in 10^ giornata.

Cavia n° 04 — Ha ricevuto un'unica inoculazione di Trich. gyps. ast. guarita in 18^ giornata. Riposo di 2 mesi, quindi reinoculazinoi di Ach. Quinq. In 4^ giornata lieve arrossamento, in 7^ edema. Infiltrazione intensa. In 20^ giornata guarigione totale delle reinoculazioni, reperto positivo di miceti in 10^ giornata.

B): Reinoculazioni crociate: Achorion Quinqueanum (prima); Tricophyton gypseum asteroides (dopo).

Cavia n° 018 — Ha ricevuto 22 inoculazioni di Ach. Quinq. Guarigione in 30^ giornata. Inizio delle reinoculazioni di Tric. gyps. ast. in 31^ giornata. Al 4° giorno arrossamento lieve che diventa intenso al 7° e si mantiene tale fino al 10°. Le reinoculazioni si prolungano fino al 12° giorno: a questo punto é già evidente il declino della lesione che guarisce in 20^ giornata. Reperto positivo di miceti al 12° giorno.

L'osservazione dello svolgersi delle alterazioni patologiche cutanee durante queste reinoculazioni crociate ha messo in evidenza anzitutto una precoce reazione infiammatoria che però non ha mai raggiunto intensità notevoli mantenendosi a lungo. Da notarsi il reperto di miceti che permane piuttosto a lungo.

Quarto gruppo

Animali pretrattati con iniezioni sottocutanee di Tricofitina e successivamente inoculati per via epicutanea con *Tric. gyps. ast.*

Cavia n° 40 — Riceve per quattro giorni quotidianamente per via sottocutanea cc. 0,5 di Tricofitina. Nessuna reazione locale, in 7^ giornata inoculazione, previa scarificazione superficiale, di Tric. gyps. ast. Nei giorni seguenti nessun fatto reaativo. L'evoluzione della lesione eritemato-squammosa fa rilevare in 10△ giornata l'affermarsi di una lesione eritemato-squammo-crostosa piuttosto vivace, infiltrata, superiore a quella del controllo. Guarigione in 26^ giornata.

Cavia n° 41 — Riceve in 10 giorni 6 iniezioni sottocutanee ciascuna di 0,5 cc. di tricofitina. In 12^ giornata inoculazione di Tric. gyps. ast. per via epicutanea, previa scarificazione. Nessun diffuso, in 10^ chiazza eritemato-squammosa molto infiltrata. Acme al 13° e 14° giorno. Guarigione in 25^ giornata.

Cavia n° 42 — Riceve per 15 giorni 10 iniezioni sottocutanee, ciascuna di cc. 0,5 di tricofitina. In 20^ giornata la inoculazione di Tric. gyps. ast. Nessuna reazione immediata; in 7^ giornata arrossamento diffuso. In 11^ giornata chiazza eritemato-squammosa circoscritta. In 13^ lesioni in atto a tipo classico. Guarigione in 23^ giornata.

Cavia n° 43 — Riceve in 15 giorni 15 iniezioni sottocute di tricofitina ciascuna di 0,5 cc. In 20^ giornata inoculazione di Tric. gyps. ast. Nessuna reazione immediata. In 6^ giornata chiazza eritematosa. Acme in 12^ giornata. Rapida decrescenza con guarigione al 22° giorno.

Cavia n° 44 — **Cavia n° 45** — Ricevono in 40 giorni 30 iniezioni di trocofitina ciascuna di 0,5 cc. In 45^ giornata inoculazione, previa scarificazione, di Tric. gyps. ast. In 4^ giornata chiazze eritematose che si accentuano successivamente. Acme in 9^ giornata con la comparsa di una lesione eritemato-squammosa molto circoscritta e con fatti infiammatori meno intensi di quelli che compaiono nella cavia di controllo. In 12^ giornata brusca diminuzione dei fatti flogistici. Guarigione in 18^ giornata.

Il pretrattamento dell'animale (cavia) con tricofitina modifica il decorso della succiva inoculazione del micete nel senso di accrescerne l'entità allorché la quantità di antigene iniettata é limitata (cavia no 40 e 41); mentre non porta nessuna variazione nell'entità dei fatti infiammatori se l'introduzione é più protratta e, quindi, quantitavivamente piú abbondante, provoca però una più pronta insorgenza ed una più rapida guarigione del focolaio (cavia n° 42 e 43) a confronto dei controlli.

Se invece l'introduzione dell'antigeno é molto protratta e di conseguenza molto abbondante, l'inoculazione é seguita rapidamente dalla comparsa di una reazione infoammatoria molto attenuata cui segue una pronta decrescenza e guarigione.

Conclusioni

Dalle ricerche fatte possiamo trarre qualche deduzione che, pur non essendo definitive, portauo un certo contributo alla patologia sperimentale della dematomicosi.

I) Il ripetere le inoculazioni per via epicutanea con lo stesso micete in un punto sempre identico dell'animale tipo (cavia), anzichè portare ad un'attenuarsi progressivo della lesione provocata, ne esalta notevolmente l'acuzie, conduce al costituirsi di alterazioni cutanee a carattere intensamente infiammatorio.

II) Nelle reinoculazioni omologhe e crociate eseguite con la stessa tecnica in numero piuttosto rilevante si ossrva che le lsioni insorte, invece di tendere a rapida risoluzione, si stabilizzano e durano a lungo. Ciò nettamente in contrasto con quanto è noto sulle reinoculazioni costituite da un unico apporto al micete.

III) Il reperto del micete in queste reinoculazioni si mantiene dimostrabile a lungo: anche qui si acquisisce un dato che è in contrasto con quanto è stato osservato dopo un'unica reinoculazione.

IV) Il pretrattamento con tricofitina degli animali che poi ricevono un'unica inoculazione di micete influenza nettamente l'aspetto della micosi che insorge: ciò avviene in aumento o in diminuzione a seconda della quantità di antigeno introdotto.

In un tentativo di interpretare il particolare quadro clinico che si osserva con tutta questa modalità di indagine, è suggestivo prospettare la possibilità che l'introduzione continuata di piccole cariche fungine con la modificazione del substrato venga a creare una condizione di iperrecettività che deve avere giuoco importante nell' insorgenza, nel particolare decorso ed aspetto della lesione.

Questa condizione, per quanto almeno è stato osservato, nelle nostre ricerche, appare legata in modo particolare alla inoculazione continuata di piccole quantità di germi vivi.

V) Questa possibilità di mettere in rapporto il quadro clinico ottenuto e un eventuale stato di iperrecettività, è sempre fun zione dello stabilirsi di uno stato allergico del tipo iperergico.

Riportandoci dopo queste acquisizioni alle lesioni umane del tipo infiammatorio (follicoliti, „Kerion", ecc.) che sappiamo causate da miceti della specie da noi usati nelle nostre ricerche, si potrebbe prospettare la possibilità che il particolare aspetto, decorso, esito delle lesioni sia da riportarsi allo stabilirsi di uno stato di iperecettività che va di pari passo con lo stabilirsi del movimento allergico. Quindi ancora si potrebbe avanzare l'ipotesi che a parità di micete le forme torpide („tinea tonsurans") siano legate ad un u'unica inoculazione e quelle infiammatorie (follicoliti, „Kerion", ecc.) ad inoculazioni multiple.

Non si deve escludere che accanto a questi fattori basilari si debba sempre tener conto della virulenza del micete e dell'attività costituzionale reattiva del soggetto. Ipotesi che però va posta come spunto di lavoro che attende conferma da ricerche da svolgersi con lo stesso indirizzo di quelle da noi eseguite negli animali.

RIASSUNTO = L'A. ha eseguito una serie di ricerche sperimentali sulla cavia consistenti in inoculazioni ripetute per molti giorni per via epicutanea di Tric. Gyps. Ast., Ach. Quinq., Micr. Lan., in reinoculazioni omologhe e crociate ripetute, inoculazioni in animali pretrattati con iniezioni di tricofitina. L'A ha constatato che l ripetere le inoculazioni porta al costituirsi di alterazioni cutanee a carattere intensamente infiammatorio anzichè portare ad un'attenuarsi progressivo delle lesioni. Nelle reinoculazioni omologhe e crociate le lesioni insorte invece di tendere ad una rapida risoluzione si stabiliscono e durano a lungo. Il pretrattamento con tricofitina in animali, che poi ricevono un'unica inoculazione, influenza nettamente l'aspetto della micosi che insorge; ciò avviene in aumento o in diminuzione a seconda della quantità di antigene iniettato. Riportandosi dopo queste acquisizioni alle lesioni umane del tipo infiammatorio l'A.

prospetta l'ipotesi che esse siano legate ad inoculazioni multiple e le forme torpide, a parità di micete, ad un'unica inoculazione.

RéSUMé = L'A. a fait une serie de recherches experimentales sur le cobaye, consistent dans des inoculations de Tric. Gyps. Ast., Ach. Quinq., Micr. Lan., répétées pendant plusieurs jours, par la voie épidermique, dan des réinoculations homologiques et croisées répétées et des inoculations dans des animaux traités précedentement avec des injections de tricophytine. L'A a constaté che la répétition des inoculations cause des alterations cutanées d'une nature fortement inflammatoire. Dans les réinoculations homologues et croisées, les lésions surgies au lieu d'aboutir à une rapide résolution, se fixent et durent longuement. Le traitement préventif avec de la tricophitine dans des animaux qui seront inoculés une seule fois, influence clairement l'aspect de la naissante mycose, qui sera plus faible ou plus forte, selon la quantitè des fongus injecté. Aprés ces acquisitions l'A. se référant aux lesions humaines d'une nature inflammatoire, exprime l'hypothèse qu'elles soient en rapport avec des inoculations multiples et que les formes atones, avec le même fongus, soient en rapport avec une unique inoculation.

SUMMARY = The A. has attendet to a series of experimental researches on the guinea pig, consisting of inoculations of Tric. Gyps. Ast., Ach. Quinq., Micr. Lan., repeated during many days, by epidermidal way, of reinoculations repeated homologous and crossed and of inoculations is animals preventively treated with trichophitin injections. The A. has ascertained that repetition of the inoculations brings about alterations of a nature intensely inflammatory, instead of bringing about the progressive decrease of the lesions. In the homologous and crossed reinoculations, the originated lesions, instead of showing a tendency to a rapid resolution, settle down and last long. The preventive to a rapid resolution, settle down and last long. The preventive treatment with trichophitin in animals that will aftewards be inoculated only once, affect clearly the aspect of the rising mycosis that will be weaker or stronger, according to the quantity of the injected trichophitin. Alter these acquisitions, the A. referring to the human lesions of an inflammatory nature, expresses the hipothesis that they may be connected with multiple inoculations and that the torpid forms, with he same quantity of fungus, may be connected with one single inoculation.

ZUSAMMENFASSUNG = Der V. hat eine versuchsreihe an dem Meerschweinchen durchgeführt. Diese bestand aus viele Tage durch wiederholten Einimpflungen von Tric. Gyps. Ast., Ach. Quinq., Micr. Lan., auf dem epidermoidalen Wege, aus homologen und gekreuzten wiederholten Wiedereinimpfungen und aus Einimpfungen an mit Trichophiteimspritzungen vorbehandelten Tieren. Der V. hat festgestellt dafz die Wiederholung der Einimpfungen zur Entstehung hochentzündlicher hautartiger Veränderungen führt statt zu einer Verminderung der fortschreitenden Verletzungen zu führen. In den homologen und gekrezten Wiedereinimpfungen lassen sich die aufgetretenen Verletzungen nieder und dauern lange, statt zu einer schnellen Entscheidung zu neigen. Die Vorbehandlung mit Trichophitin an Tieren, die nachher eine einzige Einimpfung bekommen werden, beëinflüsst deutlich das Aussehen der auftretenden Mycosis,

die je nach der Menge an eingespritztem Trichophitin stärker oder schwächer sein wird. Nach diesen Erwerben, bezieht sich der V. auf die entzündlichen Menschenverletzungen und nimmt an dafs sie mit vielfachen Einimpfungen und die torpiden Formen, bei gleichen Pilze, mit einer einzigen Einimpfungen verbinden sind.

Bibliografia

TRUFFI M., Giorn. It. Malat. Ven. Pelle., **66**, 1901; 25, 1902. — TRUFFI M., Giorn. It. Malat. Ven. Pelle., 29, 1904. — BLOCH R. u. MASSINI R., Zeitschr. f. Hygiene u. Infect. Krank., **13**, 68, 1909. — RADAELI A., Giorn. It. Dermat., 612, 1925. — RIVALIER A., Ann. Dermat. et Syph., 619, 1929. — KADISCH E., Arch. f. Derm., **158**, 344, 1929. — JADASSHON J. SCHAFF, Zbt. f. Haut u. Gesch. Krank., **44**, 520, 1934. — ZALKAN P. M. et KISILEVA M. L., Zbt. f. Haut u. Gesch. Krank., **65**, 207, 1940.

Potere patogeno dei Dermatomiceti sull'occhio [1])

Studio clinico e sperimentale

per

A. Giardini e F. Seri

(Dalla Clinica Oculista e dalla Clinica Dermatologica della Università di Pavia)

Introduzione.

Il capitolo delle micosi oculari, pur non rappresentando nella pratica clinica una parte molto importante delle malattie oftalmiche, è stato ampiamente studiato da molti AA., sia nei riguardi delle manifestazioni oculari dell'uomo che in quelle dell'animale, provocate sperimentalmente. I numerosi lavori comparsi sull'argomento ci dispensano dal dilungarci sulle micosi oculari più frequenti a riscontrarsi nella pratica clinica quali le actinomicosi, le aspergillosi, le penicilliosi, le sporotricosi, le micosi da fermenti e pseudo fermenti ed altre più rare e di minore importanza quali le mucormicosi, le oosporosi, ecc.

Per quanto riguarda i dermatomiceti bisogna anzitutto distinguere le lesioni che essi possono provocare su alcuni annessi oculari da quelle del segmento corneo-congiuntivale. Infatti mentre numerose e ben descritte sono le affezioni della cute palpebrale, delle ciglia e sopraciglia, rarissime sono le presunte localizzazioni corneo-congiuntivali. D'altra parte le prime di queste hanno solo un interesse casistico giacchè esse non rappresentano che una sporadica localizzazione dei dermatomiceti sviluppatisi su una particolare regione cutanea che possiede le stesse caratteristiche strutturali del rimanente mantello cutaneo-pilifero.

Prendendo in considerazione le affezioni della cute palpebrale, delle sopraciglia e ciglia vediamo che molto rare sono le segnalazioni di localizzazioni microsporiche della regione palpebro-sopracigliare: non ci risulta che in Italia siano stati descritti casi del genere e anche in altri paesi, ove la microsporia è più frequente che da noi, i casi noti sono piuttosto rari. Ricordiamo quelli di Zollikofer e di Wenner (1908) localizzati uno al sopraciglio e l'altro alle palpebre inferiori (Microsporon lanosum), quello di Wirtz (1922) alle palpebre, in cui però si trattava di un'infezione mista (Microsporon ed Achorion schönleini) ed infine un ultimo di Fazakas (1938) sempre alla palpebra (Microsporon felineum). Non abbiamo trovato nella letteratura nessun caso di affezione microsporica delle ciglia e margine cigliare.

Molto più frequenti sono invece le micosi da Tricophyton e da Achorion della regione palpebro-sopracigliare, che in genere si accompagnano o più spesso rappresentano una estensione di micosi della cute del viso. Di solito

1) Gli AA. hanno collaborato al lavoro in parti uguali.

esse interessano sia le palpebre che le ciglia ed il sopraciglio, più di rado invece colpiscono una di queste regioni isolatamente.

I casi di tricofizia esclusivamente localizzati alla regione sopracigliare sono riportati fino al 1928 da Cavara: Sabouraud (1910), Ramognini (1915), Pais (1924), Bertolotti (1925). In seguito non ne sono stati descritti altri anche perchè probabilmente i dermatologi, che più spesso possono osservare casi del genere, non ne fanno oggetto di descrizione. Inoltre si deve tener presente che il sopraciglio, pur potendo essere circondato o inglobato in chiazze tricofitiche, offre una certa resistenza all'invasione del micete e, se invaso, non dà quasi mai lesioni di tipo infiammatorio (Cavara). Per quanto riguarda l'Achorion ricordiamo che nessuna osservazione è stata descritta di localizzazione primitiva al sopraciglio, mentre in casi molto rari (Talat, Arcoleo) questo può essere interessato nel corso di favo generalizzato.

Assai numerosi sono i casi di micosi tricofitiche e favose alle palpebre ed al margine con interessamento o meno della ciglia, casi accuratamente raccolti fino al 1928 dal Cavara nella sua monografia, cui per brevità rimandiamo anche a proposito della descrizione clinica delle lesioni che d'altra parte non assumono abitualmente caratteri differenti da quelle delle rimanenti zone cutanee e pilifere. Facciamo solo presente che la blefarite tricofitica, ben descritta in Italia da Mibelli, Maiocchi, Truffi, Lombardo, ecc., ha in genere tendenza, contrariamente a quanto avviene per il sopraciglio, a dare manifestazioni infiammatorie e pare non sia mai stata descritta come lesione completamente isolata.

In questi ultimi anni abbiamo trovato nella letteratura il caso di Pignot nel 1930 sulla palpebra (Achorion gypseum) e due casi di Nemeth nel 1941 sulle palpebre e ciglia (Tricophyton). Aggiungiamo poi un caso di blefarite tricofitica osservato da uno di noi (Serri) in una bambina affetta da kerion del cuoio capelluto (fungo isolato Tricophyton gypseum asteroides): alcune ciglia si presentavano tronche all'ostio follicolare ed all'esame microscopico ripiene di spore. Caratteristica di questo caso era l'assoluta mancanza di fatti infiammatori a carico del bordo cigliare, in constrasto con quanto sopradetto a proposito delle blefariti tricofitiche.

Come già abbiamo precedentemente accennato, rarissime sono nella letteratura le osservazioni cliniche di affezioni corneo-congiuntivali riferibili senz'altro ai dermatomiceti. Milian e Lelong nel 1923 hanno presentato alla Soc. Fr. di Dermatologia un caso di cheratocongiuntivite tricofitica insorta in una bambina di sei anni che aveva contemporaneamente una micosi infiammatoria della cute palpebrale. Gli AA. ritennero che l'alterazione corneo-congiuntivale fosse di natura tricofitica per la presenza delle tipiche lesioni tricofitiche cutanee e per il criterio ex juvantibus (iniezioni endovenose di Lugol e terapia iodica locale), anche se non vennero riscontrati dei miceti nella congiuntiva.

Leszcynski, sempre nello stesso anno, descrisse il caso di un ragazzo di 14 anni portatore di tricofizia al viso ed alla palpebra superiore con contemporanea congiuntivite ed eruzione a tipo lichen tricofitico al tronco. Un'iniezione di 0,1 cc. di trocofitina all'1% determinò un' imponente reazione generale e locale, con forte iperemia congiuntivale, lacrimazione e fotofobia. Secondo l'A. la reazione alla tricofitina rappresentò l'unica prova della specificità di questo tipo di congiuntivite non essendo stati isolati dei miceti dal secreto congiuntivale.

Nel 1930 Muende e Ruete descrissero ambedue un caso di congiuntivite

insorta in soggetto portatore di tricofizia profonda, in cui si era sviluppata contemporaneamente una tricofitide generalizzata. Sia l'uno che l'altro A. ritennero la manifestazione oculare come una manifestazione allergica della mucosa, non avendo riscontrato miceti nel secreto congiuntivale.

A questi quattro casi va aggiunto quello descritto recentemente da uno di noi (Giardini), di una bambina di 9 anni portatrice di microsporia infiammatoria del dorso della mano destra, nella quale si era sviluppata una congiuntivite ribelle ad ogni trattamento nell'occhio dello stesso lato. In seguito ad una prima iniezione di tricofitina si ebbe una violenta reazione generale e locale; dopo una seconda la congiuntivite comparve anche nell'altro occhio. Continuando il trattamento con tricofitina per via ipodermica e terapia locale specifica della dermatosi, con la regressione di essa anche la congiuntivite andò a guarigione. Da notarsi che in questo caso non si aveva fitide generalizzata come in quelli di Leszcynski, di Muende e di Ruete: pur tuttavia la congiuntivite è stata interpretata quale manifestazione isolata di microsporide, in base ai dati soggettivi che caratterizzavano le alterazioni oculari ed alle reazioni umorali e congiuntivali comparse dopo iniezione di tricofitina.

Oltre che nelle tricofizie e microsporie, esistono alcune osservazioni di supposte lesioni del bulbo oculare anche nel favo, che però risalgono a molti anni or sono e non sono state seguite, a quanto ci risulta, da altre analoghe. La prima è quella di Rampoldi (1882) il quale in alcuni pazienti affetti da tigna favosa del cuoio capelluto, osservò contemporaneamente un'irite ed irido-ciclite che sospettò di natura fungina, pur mancando qualsiasi reperto obiettivo a sostegno della sua ipotesi.

Più probativo del precedente è il caso descritto da Mc Hardy, (1885) che presentava sulla congiuntiva tarsale superiore un'ulcera a rapida estensione e molto dolorosa che l'A. ritenne provocata da un Achorion; il paziente abitava in una casa piena di topi infetti e la lesione congiuntivale guarì subito dopo completa escissione del focolaio.

Ricordiamo infine l'osservazione di Machek (1912): in un giovane che era stato affetto da favo del capillizio, egli riscontrò alla distanza di quattro mesi circa una lesione discoidale, rilevata, di colorito giallastro, occupante parte della cornea e della congiuntiva bulbare. Pur non avendo isolato l'Achorion, l'A. ritenne tale neoproduzione corneo-congiuntivale di natura micotica.

Come si può constatare dall'esame dei pochi casi descritti nella letteratura, mai sono stati isolati dermatomiceti dalle lesioni del segmento corneo-congiuntivale. Ciò è in accordo con le ricerche di Fazakas (1938), il quale in un notevole numero di oculopazienti e di sani isolò 22 specie di funghi differenti, senza mai riscontrare dermatomiceti; solo in un caso un Microsporon felineum fu coltivato oltrechè dal cuoio capelluto anche dalle palpebre.

D'altra parte dobbiamo ricordare la singolare osservazione di Deuchler (1930) che in sette persone, indenni dal punto di vista cutaneo ed affette da una congiuntivite cronica di lieve grado senza alcun particolare carattere, esaminando il secreto congiuntivale, mise in evidenza morfologicamente e culturalmente un Tricophyton cerebriforme. Tale riscontro fu positivo in qualche caso solo in un occhio, mentre clinicamente ambedue gli occhi presentavano le stesse alterazioni. E' ineltre da notare che la secrezione era relativamente scarsa e povera di cellule, e l'esame istologico della congiuntiva, escissa in due casi, mostrò una leggera infiltrazione plasma-

cellulare con assenza di elementi fungini. Deuchler pensò che ricerche con inoculazioni sugli animali ed altre prove biologiche avrebbero potuto chiarire tale problema, il che fu prospettato anche da Darier nella discussione del caso presentato da Milian e Lelong alla Società Fr. di Dermatologia.

Al riguardo le ricerche sperimentali sul potere patogeno dei dermatomiceti sui tessuti oculari veri e propri sono in verità molto scarse e tendono sopratutto a confermare particolarità biologiche dei dermatomiceti, già ampiamente studiate nel campo dermatologico (Jadassohn, Sulzberger, Truffi, ecc.), riguardanti cioè la spiccata elettività di questi funghi ad accrescersi solo su tessuti non vitali.

Jadassohn e Rehsteiner (1930) hanno deposto sulla cornea scarificata di sei cavie una sospensione di Achorion quinckeanum non ottenendo alcun accrescimento del micete. Al contrario inoculando nel cristallino di conigli e cavie ceppi di Achorion quinckeanum e schoenleini e di Trichophiton gypseum ottennero la crescita dei funghi negli strati profondi della corticale; senza esito fu invece l'inoculazione con un ceppo di Microsporon furfur.

Nel 1937 Tamponi e Mecca, rifacendosi alle sopradette esperienze ed usando sospensione di spore di Trichophiton gypseum asteroides hanno praticato le ricerche seguenti: inoculazione nello spessore del cristallino, inoculazione in camera anteriore previa discissione della lente, inoculazione endocardiaca e successiva lesione della lente e dell'iride, coltivazione del fungo su terreni costituiti da solo materiale lenticolare o con aggiunta di Sabouraud, ed infine coltivazione in terreni culturali delle lenti inoculate. I risultati di queste esperienze confermarono quanto già avevano rilevato Jadassohn e Rehsteiner, con la differenza che negli animali trattati da Tamponi e Mecca si svilupparono secondariamente dei fatti infiammatori che essi interpretarono di natura reattiva tossica e non microbica. Negative furono invece le prove di inoculazione in camera anteriore previa discissione della lente — il fungo cresceva solo nella parte residua del cristallino —, ed endocardiaca seguita immediatamente da vasta discissione della lente e traumatismo dell'iride.

La coltivazione del Trichophiton gypseum asteroides nei terreni aventi le caratteristiche sopradette diede sempre luogo ad una rigogliosa crescita del fungo.

Dobbiamo per ultimo ricordare l'osservazione isolata di Fischer, (1923) che in seguito ad una iniezione endovenosa di Achorion in un coniglio, vide formarsi un focolaio infiammatorio distruttivo endobulbare.

Parte prima.

Potere patogeno del Tricophyton gypseum asteroides e del Microsporon lanosum sull'occhio del coniglio sano e del coniglio portatore di dermatomicosi sperimentale

Come abbiamo già fatto rilevare molto scarse sono le ricerche sperimentali intese a chiarire quale sia l'effettivo potere patogeno dei dermatomiceti sulle varie parti dell'occhio. Quelle testè ricordate nella parte introduttiva sono orientate essenzialmente alla risoluzione di problemi che non presentano una diretta e pratica attinenza con i casi clinici che abbiamo sopra riportato.

Tali esperienze inoltre sono state condotte in modo esauriente solo sul cristallino, organo che per la scarsa vitalità delle sue parti interne,

paragonabile a quella dello stato corneo dell'epidermide, consente una rigogliosa crescita dei dermatomiceti in esso inoculati.

Sulla cornea soltanto Jadassohn e Rehsteiner hanno studiato il potere patogeno di un unico ceppo di Achorion, operando su un lotto di 6 cavie sane e con un'unica modalità di introduzione (apposizione del materiale fungino previa scarificazione). Tutte le altre parti dell'occhio non sono mai state prese in considerazione, ivi compresa la congiuntiva che abitualmente è l'unica interessata nel corso di dermatomicosi.

Le congiuntiviti descritte da vari AA. erano sempre secondarie ad una dermatomicosi di tipo infiammatorio e si svilupparono in soggetti giovani con o senza micide generalizzata e, pur essendo sempre stata dimostrata la loro diretta dipendenza della micosi cutanea, mai si è potuto mettere in evidenza in esse l'eventuale agente patogeno fungino. Esse sono state quindi interpretate come reazioni allergiche o tossiche soprattutto per le reazioni a focolaio ch'esse presentavano in seguito all'introduzione di tricofitina. D'altra parte deve essere tenuto presente il fatto che Deuchler ha isolato un Tricophyton dal secreto congiuntivale di pazienti affetti da congiuntivite cronica il che, associato alle osservazioni di Machek, Mc Hardy e di Rampoldi, lascia sempre adito al dubbio che in particolari condizioni i dermatomiceti possano impiantarsi direttamente su alcuni tessuti oculari e sopratutto sul segmento corneocongiuntivale.

Per tutti questi motivi abbiamo creduto opportuno istituire una serie di ricerche sperimentali intese a stabilire il comportamento delle varie parti oculari sia nell'animale sano che in quello portatore di micosi infiammatoria cutanea, in seguito all'inoculazione con alcuni dermatomiceti.

Allo scopo ci siamo serviti di due ceppi isolati da lesioni cutanee altamente infiammatorie che avevano provocato anche manifestazioni patologiche oculari. Il primo di essi infatti era un Trichophyton gypseum asteroides (T.g.a.) coltivato dalla bambina portatrice di kerion alla nuca e blefarite tricofitica, della quale già abbiamo fatto cenno. Il secondo era un Microsporon lanosum (M.l.) isolato da una microsporia profonda della mano in cui erasi manifestata anche una microbide congiuntivale; tale caso, già in precedenza ricordato, è stato da uno di noi illustrato e discusso in altra pubblicazione. Il T.g.a. presentava in Sabouraud una vivacità di crescita notevole, superiore a quella del M.l.

L'animale di scelta è stato il coniglio sia per la grandezza dell'occhio che meglio di quello della cavia si presta all'osservazione specie con la lampada a fessura, sia perchè le micosi cutanee nel coniglio si avvicinano di più a quelle umane (Kusunoki, Jessner) ed infine per la maggior sensibilità della cute del coniglio al T.g.a.

Il materiale da inoculare veniva preparato con le seguenti modalità: dal feltro di culture di 20—30 giorni in agar pepto-glucosato di Sabouraud veniva prelevata una quantità constante di elementi fungini a cui, dopo fine triturazione in mortaio sterile, era aggiunta una quantità fissa di soluzione di NaCl al 0,75 %.

Il potere patogeno di questi dermatomiceti è stato saggiato mediante instillazione ed iniezione, nella congiuntiva, nella cornea, nella camera anteriore e nel vitreo in conigli sani ed in conigli portatori di micosi infiammatoria, provocata artatamente sulla cute del dorso, in differenti momenti di stato allergico come più avanti preciseremo. La quantità di materiale inoculato è sempre stata costante: due gocce per le instillazioni e 0,1 o 0,05 cc. per le iniezioni. Sono stati abitualmente eseguiti controlli

usando sempre la stessa sospensione fungina sterilizzata mediante riscaldamento a 120° in autoclave.

ESPERIENZE.

I° gruppo: conigli sani

CONGIUNTIVA

1) Instillazione congiuntivale. Per 3 giorni si sono praticate instillazioni biquotidiane di sospensione fungina di T.g.a. (3 conigli) e di M.l. (2 conigli). Nessuna particolare alterazione a carico della congiuntiva è stata osservata.
2) Instillazione previa tarsorrafia. L'instillazione di sospensione fungina di T.g.a. (2 conigli) e di M.l. (1 coniglio), non ha provocato alcuna particulare alterazione in due animali; nel terzo, trattato con T.g.a., si è notato, al 4° giorno, che dalla cavità congiuntivale fuoriusciva una modica secrezione mucosa. Tolti i gunti in 6a giornata, la congiuntiva appariva iperemica, sopratutto nelle sue parti declivi; lo striscio della secrezione, prelevata dal fornice inferiore, ha messo in evidenza alcune spore e filamenti miceliali. Semplici lavaggi di soluzione fisiologica hanno fatto regredire tale quadro congiuntivale nel giro di pochi giorni.
3) Instillazione previa scarificazione della congiuntiva. L'instillazione di sospensione di T.g.a. (1 coniglio) e di M.l. (1 coniglio) non ha provocato alcuna evidente alterazione, se si eccettua una lieve e fugace reazione al traumatismo.

   In tutte le esperienze finora praticate con instillazioni di elementi fungini vivi si è verificata in alcuni animali, alla distanza di 7—8 giorni, la comparsa di manifestazioni micotiche a carico delle ciglia e della cute palpebrale. Anche in questa evenienza la congiuntiva non presentò alcuna reazione.
4) Le stesse esperienze di cui ai paragrafi 1) 2) 3), ripetute in ugual numero di animali usando sospensioni di T.g.a. e di M.l. sterilizzate a 120° in autoclave, hanno avuto costante risultato negativo.
5) Iniezione sottocongiuntivale. Sono state usate sospensioni di T. g.a. (3 conigli) e di M.l. (2 conigli) iniettendone 0,1 cc. o nella congiuntiva bulbare o in quella della piega di passaggio. Nessuna particolare differenza di comportamento si è notata a seconda delle due specie usate.

   In 3 conigli dopo 12 ore si è osservata una lieve iperemia vasale con modico edema nel punto di iniezione e nelle zone immediatamente circostanti; dopo 24—48 ore la congiuntiva aveva ripreso un aspetto normale.

   In 2 conigli invece si ebbe nel punto di inoculazione, dopo circa 20 ore, la formazione di una rilevatezza, grande come un grano di miglio, rotondeggiante, ben delimitata, di colorito roseo giallastro, piuttosto dura, con scarsa reazione congiuntivale circostante. In un coniglio tale rilevatezza nello spazio di circa 12 giorni scomparve senza lasciare traccia. Nell'altro animale, due giorni dopo l'inoculazione, il granuloma venne asportato; l'esame istologico mise in evidenza nel connettivo sottocongiuntivale una formazione granulomatosa ben delimitata, costituita al centro essenzialmente da un ammasso di elementi fungini e da cellule di infiltrazione a tipo prevalentemente linfo-monocitario che alla periferia si addensavano a costituire quasi una barriera alla quale partecipavano anche scarsi eosinofili.
6) La stessa esperienza di cui al paragrafo 5) è stata ripetuta su 2 conigli usando sosmensioni di T.g.a. e di M.l. sterilizzate in autoclave a 120°, osservando i medesimi fenomeni già descritti poco sopra senza evidenti differenze.

CORNEA

1) Instillazione previa scarificazione corneale. L'instillazione biquotidiana di sospensione di T.g.a. (1 coniglio) e di M.l. (1 coniglio), ripetuta per 3 giorni, non ha provocato nessuna alterazione di apprezzabile entità tranne una lieve e fugace reazione dovuta al traumatismo.
2) La stessa esperienza di cui al paragrafo precedente, ripetuta usando sospensioni di T.g.a. (1 coniglio) e di M.l. (1 coniglio) sterilizzate al calore a 120°, ha avuto un uguale esito.
3) Iniezione intracorneale. Dopo aver lussato il bulbo oculare, con un ago molto sottile si penetrava tangenzialmente nello spessore del parenchima iniettando 0,05 cc. di sospensione fungina. Il liquido così iniettato si propagava centrifugamente alla punta dell'ago scollando le lamelle corneali e provocando la formazione di una chiazzetta biancastra, rotondeggiante, del diametro di 4 mm. circa.
   a) T.g.a. (5 conigli). Già dopo cinque ore circa dall'iniezione la chiazzetta biancastra era scomparsa ed all'esame biomicroscopico era possibile mettere in evidenza

solo il tragitto dell' ago con qualche tenue residuo alla fine di esso ed un lieve intorbidamento del tessuto lungo i margini del tragitto stesso. Tale quadro rimaneva immutato ancora per 24—48 ore circa.

Al 2°—3° giorno dall'iniezione, più spesso al 3°, si osservava, nella zona circostante al tragitto dell'ago o alla sua estremità, la comparsa di un infiltrato grigiastro a limiti sfumati, quasi sempre rotondeggiante, più spesso unico e grande, più raramente multiplo e di piccola estensione, che andava progressivamente allargandosi nei giorni successivi. Contemporeneamente si notava un'iniezione pericheratica molto evidente, mentre dalla periferia della cornea, nel quadrante corneale interessato, ma più spesso dall'alto, entravano piccoli fascetti di vasi diretti verso la zona del focolaio. Si notava inoltre notevole congestione dei vasi iridei con pupilla miotica immobile allo stimolo luminoso. Instillazioni con fluorescina hanno messo in evidenza alterazioni ulcerative soprastanti all'infiltrato solo in un caso.

Di solito in un periodo di tempo che andava da 25 a 50 giorni, l'infiltrato corneale regrediva man mano per venire completamente eliminato residuando come esiti delle tenui nubecole. In un caso l'infiltrato è andato invece continuamente aumentando in estensione : al 10° giorno dall'inoculazione si è praticata con un coltellino di Graefe una graduale scarificazione corneale in corrispondenza della lesione mettendo allo scoperto, in seno al parenchima stesso, una cavità dalla quale si è asportato del materiale poltaceo che è stato strisciato ed insemenzato. L'esame microscopico ha messo in evidenza numerose spore e filamenti miceliali ed assenza di germi; in un tubo di Sabouraud, di tre insemenzati, si ebbe la crescita del T.g.a — Anche in questo caso, probabilmente in seguito all'apertura e scucchiaiamento della cavità formatasi, alla distanza di 2 mesi circa la lesione era guarita residuando un piccolissimo leucoma ed una vascolarizzazione della congiuntiva bulbare in alto.

Nel coniglio ove la fluorescina aveva messo in evidenza un'ulcerazione corneale, l'esame istologico della cornea asportata ha dimostrato una perdita di sostanza piuttosto profonda, mentre le parti del parenchima circostante presentavano una infiltrazione a tipo linfo-monocitario. Non si sono messi in evidenza elementi fungini anche con colorazioni appropriate (Pappenheim), ma caratteristici corpuscoli ialini e chiazzette irregolari di pigmento di varia grandezza.

In un altro coniglio, nel quale l'instillazione di fluorescina non aveva messo in evidenza alcuna lesione superficiale corneale, mentre al ventesimo giorno si procedeva all'enucleazione dell'occhio, la cornea si perforava.

b) M.l. (2 conigli). Non si sono osservate lesioni del tipo di quelle già descritte per il T.g.a.: già dopo 24 ore dall'iniezione era scomparso qualsiasi intorbidamento corneale sé si eccettua il segno lasciatovi dal tragitto dell'ago.

4) In 3 conigli di controllo nei quali, nelle stesse condizioni di esperimento, sono state usate sospensioni fungine di T.g.a. e di M.l. sterilizzate in autoclave, già dopo poche ore si aveva il riassorbimento del materiale iniettato, residuando per qualche giorno solo la traccia del passaggio dell'ago, così come è stato notato negli esperimenti riportati al paragrafo a). Contrariamente a questi però scarsissima o nulla è stata la reazione (iniezione ciliare, congestione dei vasi iridei, ecc) e nei giorni successivi non si ebbe la comparsa delle alterazione su descritte.

CAMERA ANTERIORE

1) Partendo dal limbus sono stati iniettati in camera anteriore 0,1 cc. di sospensione di T.g.a. (2 conigli) e di M.l. (2 conigli).

Dopo 24 ore si osservava alla lampada a fessura, nella parte inferiore della camera, una piccola lunula di deposito biancastro, vi era inoltre un lieve intorbidamento diffuso dell'acqueo con l'iride un pò fosca; iniezione pericheratica di modico grado. Dopo 3 giorni la camera anteriore si presentava otticamente vuota, l'iniezione ciliare era appena accennata e l'iride ancora lievemente congesta.

Dopo 6 giorni l'occhio era normale.

2) Le stesse esperiènze di cui al paragrafo 1) ripetute con sospensione di T.g.a. e di M.l. sterilizzate in autoclave a 120° hanno provocato un quadro quasi completamente sovrapponibile al precedente per intensità e durata.

VITREO

1) Si sono praticate iniezioni di 0,1 cc. di sospensione di T.g.a. (3 conigli) e di M.l. (3 conigli) ottenendo quasi sempre lo stesso risultato.

Dopo 24 ore all'esame biomicroscopico si osservava una lieve iniezione pericheratica ed un tenue intorbidamento dell'acqueo; all'esame oftalmoscopico si intrave-

deva la presenza di un'opacità grigio-giallastra che tendeva a localizzarsi nelle parti declive di cui non era possibile mettere a fuoco i particolari. La visione delle membrane profonde era impedita a volte da un'opacità diffusa delle rimanenti parti del vitrea.

Dopo due giorni, mentre erano completamente scomparsi i lievi fatti reattivi a carico del segmento anteriore, si notava un aumento dell'opacità grigio-giallastra, più evidente negli animali inoculati con T.g.a. che in quelli con M.l. — Tale aumento proseguiva lentamente nei giorni successivi fino al 5°—6° giorno, per poi rimanere immutato alla distanza ancora di un mese dalla inoculazione.

Alcuni animali sono stati sacrificati e nell'interno del bulbo, nel punto in cui all'esame oftalmoscopico era visibile la sopradescritta chiazza, si mise in evidenza una spessa membrana di colorito bianco-latteo che all'asportazione non mostrava alcun rapporto con la sottostante retina.

L'esame microscopico e l'insemenzamento in Sabouraud di tale membrana, praticati in un coniglio al 3° giorno dall'inoculazione, diedero risultato positivo per il micete (T.g.a), mentre in un altro animale gli stessi esami, praticati al 10° giorno, ebbero esito negativo.

2) Le stessa esperienza ripetuta usando materiale fungino sterilizzato in autoclave (2 conigli), provocava dopo 24 ore un quadro biomicroscopico ed oftalmoscopico uguale a quello descritto nel paragrafo precedente; tale quadro però rimaneva immutato nei giorni sucessivi.

2° gruppo: conigli portatori di dermatomicosi sperimentale

Sono state praticate instillazioni ed inoculazioni di T.g.a. e di M.l. con la technica descritta e con i medesimi ceppi già usati per il primo gruppo di esperienze, in conigli portatori di tricofizia e microsporia di tipo infiammatorio, provocate previa rasatura dei peli e traumatismo con carta vetrata, sfregando su un'area del diametro di circa 5 cm. della cute del dorso, in prossimità del collo, alcune gocce di sospensione piuttosto densa di elementi fungini tratti da culture in agar pepto-glucosato di Sabouraud. Con ricerche preliminari abbiamo voluto esattamente osservare e seguire l'insorgere e lo svilupparsi dello stato allergico nei conigli così inoculati. Allo scopo siamo ricorsi ad iniezioni intradermiche di cc. 0,2 di tricofitina concentrata, praticate nei diversi periodi di evoluzione della lesione clinica infiammatoria con i risultati seguenti:

1°) Periodo di incubazione (5—8 giorni) : nessuna o debolissima reazione.

2°) Periodo di diffusione (8—10 giorni) : reazione debole.

3°) Periodo dell'acme (3—5 giorni) : reazione abbastanza intensa.

4°) Periodo di risoluzione (15—25 giorni) : reazione intensa fino a circa 24 giorni dalla guarigione, dopo di che essa comincia a diminuire.

L'intensità della reazione è stata da noi valutata calcolando la grandezza e la durata della papula che si produceva dopo l'iniezione intradermica di tricofitina.

Le instillazioni e le inoculazioni oculari venivano praticate :

A. In un lotto di conigli al 5°—6° giorno dopo l'innesto cutaneo quando, pur essendo talora presente un'iniziale micosi infiammatoria, la risposta cutanea alla tricofitina era debolmente positiva o ancora negativa, il più delle volte cioè durante il periodo di incubazione.

B. In un secondo lotto di conigli le inoculazioni venivano effettuate quando si era stabilita una netta risposta allergica all'introdermoreazione con tricofitina il che, secondo i controlli da noi praticati, si verificava all'incirca al 25°—35° giorno dopo l'innesto, quando già la lesione infiammatoria cutanea era in fase regressiva.

In questo secondo gruppo di esperienze le inoculazioni sono state prati

cate sopratutto sulla congiuntiva (instillazioni con e senza scarificazione congiuntivale, iniezioni sottocongiuntivali) e sulla cornea (instillazione con e senza scarificazione corneale iniezioni intraparenchimali), allo scopo di poter osservare essenzialmente il comportamento di quelle sezioni oculari (congiuntiva e cornea) che si sono dimostrate suscettibili di presentare nell'uomo alterazioni in corso di dermatomicosi.

Le inoculazioni praticate negli animali del lotto A) hanno dato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti negli animali sani del 1° gruppo di esperienze per cui riteniamo superfluo riportarli.

Solamente in un coniglio, dopo iniezione sottocongiuntivale di T.g.a. si ebbe una reazione non molto intensa del tipo di quelle che andiamo a descrivere, sebbene l'intradermo alla tricofitina fosse ancora negativa.

Le inoculazioni praticate negli animali del lotto B) hanno dato i seguenti risultati:

1) Instillazione congiuntivale. Sospensione di T.g.a (3 conigli) e di M.l. (3 conigli) instillatta 2 volte al di per 3 giorni successivi. Tessuna alterazione congiuntivale. Solo in un coniglio, nel quale era stato iniettato il T.g.a. si è osservata al 2° giorno una lieve e fugace iperemia congiuntivale, svelabile solo facendo i confronti con la congiuntiva controlaterale.
2) Instillazione previa scarificazione congiuntivale. (T.g. a.: 3 conigli; M.l.: 2 conigli).
In due conigli trattati con T.g.a. ed in uno con M.l. si è notata al 2° giorno una discreta reazione congiuntivale, più marcata nella sede di scarificazione, che regrediva lentamente per estinguersi al 6° giorno circa. Negli altri animali non si è notata alcuna evidente alterazione congiuntivale.
3) Iniezione sottocongiuntivale. (3 conigli con T.g.a. e 3 conigli con M.l.)
Si è ottenuta una pronta reazione congiuntivale evidente già 4—5 ore dopo l'iniezione; nei giorni successivi si sviluppava una vera e propria congiuntivite catarrale di media intensità della durata di 12—15 giorni.
L'insemenzamento su Sabouraud del secreto congiuntivale prelevato al 6° giorno dall'iniezione non ha mai dato luogo alla crescita del micete.
Tali reazioni congiuntivali sono state più evidenti nei conigli trattati con T.g.a. che in quelli inoculati con M.l.
5) Iniezione intracorneale. (2 conigli con T.g.a. ed 1 coniglio con T.g.a. e 2 conigli con M.l.)
L'instillazione biquotidiana, ripetuta per 3 giorni, non ha provocato alcuna alterazione di apprezzabile entità, tranne una lieve e fugace reazione al 2° giorno in 2 conigli.
5) Iniezione intracorneale. (2 conigli con T.g.a ed 1 coniglio con M.l.) 24 ore dopo l'iniezione intraparenchimale si osservava un denso infiltrato nel punto di iniezione della sospensione, attorniato da un edema diffuso della cornea che non si era notato negli animali sani; contemporaneamente si aveva un'intensa iniezione pericheratica. L'osservazione delle regioni retrostanti alla cornea era difficoltata dall'intorbidamento corneale stesso: si potevano però osservare in camera anteriore, specie nelle parti inferiori, dei piccolissimi fiocchetti di essudato biancastro. L'ulteriore progresso delle lesioni corneali avveniva poi all'incirca con i medesimi caratteri già descritti nei conigli non portatori di tricofizia e microsporia infiammatoria cutanea, tanto che al 20°—25° giorno in media le lesioni erano completamente sparite, residuando solo una tenue albugine nel punto in cui era stata praticata l'iniezione.

Le lesioni del coniglio inoculato con M.l. erano di grado molto inferiore a quelle provocate dal T.g.a.

6) Iniezione in camera anteriore. (1 coniglio con T.g.a. ed 1 coniglio con M.l.)
Dopo 12 ore iniezione pericheratica intensa, all'esame biomicroscopico intorbidamento marcato dell'acqueo con qualche deposito biancastro puntiforme a tipo ciclitico depositato nelle parti declivi della superficie posteriore della cornea; iride opaca, miotica, non reagente. Tale quadro dopo 36 ore era un pò aggravato; rimaneva stazionario per altri 2 giorni circa, poi lentamente regrediva.
La reazione è stata più accentuata nel coniglio inoculato con T.g.a. che nello stesso

tempo presentava una reattività cutanea alla tricofitina molto più marcata di quello inoculato con M.l. Nel coniglio trattato con M.l. un prelievo dell'acqueo al 3° giorno è stato insemenzato in Sabouraud senza esito alcuno.

7) Iniezione nel vitreo. (1 coniglio con T.g.a. ed 1 coniglio con M.l.) Il quadro oftalmoscopico, sia per aspetto che per intensità, aveva le stesse caratteristiche che abbiamo già descritto per il coniglio sano.

Molto più accentuata invece era la reazione del segmento anteriore osservabile con la lampada a fessura.

Parte seconda.

Reazioni oculari alla tricofitina nel coniglio e nell'uomo

Pochi AA. (Lombardo, Sutter) si sono occupati delle reazioni oculari alla tricofitina. Le rare notizie che si possono trarre dalla letteratura fanno parte del complesso di ricerche sperimentali compiute sopratutto dai dermatologi allo scopo di osservare in quale modo reagissero le varie parti di un organismo affetto da tricofizia infiammatoria all'introduzione di tricofitina. Tali ricerche d'altra parte giungono a risultati piuttosto contrastanti fra loro e non definitivi: mentre infatti Lombardo, sia nei conigli che nell'uomo affetti da tricofizia infiammatoria, non ha mai osservato una oftalmoreazione positiva, Sutter riferisce di aver osservato a 24 ore di distanza una forte congiuntivite in un tricofitico in cui aveva instillato alcune gocce di tricofitina ad altra concentrazione. Lo stesso A. asserisce inoltre di aver avuto una conferma sperimentale a questa osservazione, ottenendo molto spesso una oftalmoreazione positiva con tricofitina in cavie portatrici di tricofizia cutanea molto diffusa.

Allo scopo di chiarire questo punto controverso e non definito e quale necessario complemento alle ricerche sinora descritte, ci è parso interessante studiare il comportamento della congiuntiva e della cornea all'introduzione di tricofitina, sia nell'animale che nell'uomo sani e portatori di tricofizia infiammatoria.

ESPERIENZE

1° gruppo: conigli sani e conigli portatori di dermatomicosi sperimentale

Con la tecnica già descritta nella Ia parte e nelle stesse modalità usate per le sospensioni fungine, abbiamo praticato instillazioni ed inoculazioni in congiuntiva e cornea di tricofitina concentrata da noi preparata.

Sono stati usati conigli sani e portatori di tricofizia profonda cutanea da T.g.a: in questi ultimi, come nelle esperienze precedenti, abbiamo introdotto la tricofitina al 6° ed al 25° giorno dall'innesto della micosi cutanea, con parallelo controllo sulla cute dello stato alergico che andava instaurandosi.

1) Instillazioni congiuntivali. Tre volte al giorno si sono praticate instillazioni di tricofitina sia nell'animale sano (2 conigli) che in quello portatore di tricofizia al 6° (2 conigli) ed al 25° (2 conigli) giorno.
Non si è verificata alcuna alterazione congiuntivale.

2) Iniezione sottocongiuntivale. (3 conigli) Mentre nel coniglio al 6° giorno dall'inoculazione (intradermo alla tricofitina negativa) ha dato luogo solo a fatti reattivi lievi e fugacissimi, in quello portatore di tricofizia al 25° giorno dall'innesto (intradermo alla tricofitina fortemente positiva), ha provocato una netta congiuntivite con secrezione catarrale piuttosto scarsa.

3) Iniezione intracorneale. Nel coniglio sano e in quello tricofitico al 6° giorno dall'innesto, le alterazioni provocate dall'introduzione intraparenchimale di tricofitina erano completamente scomparse dopo 12—24 ore dall'iniezione. Invece nei comgilo al 25° giorno dall'innesto, si sviluppava una evidente congiuntivite, di grado inferiore però a quella riscontrata nei conigli trattati con iniezione

sottocongiuntivale di tricofitina; la cornea invece, già dopo 24 ore, non presentava alterazioni di sorta, se si eccettua il segno lasciatovi dall'ago.

2° gruppo: Uomo sano e uomo portatore di dermatomicosi profonda

1) Instillazione congiuntivale. Praticata 3 volte al dì in 5 soggetti portatori di tricofizia infiammatoria (T.g.a.), con netta rispostà cutanea alla iniezione intradermica di tricofitina, non ha messo in evidenza alcuna reazione congiuntivale.
Lo stesso comportamento ebbero i controlli su individui sani.
2) Iniezione sottocongiuntivale. L'iniezione di 0,1 cc. praticata nella parte inferiore della congiuntiva bulbare in 3 soggetti portatori di tricofizia infiammatoria della barba (T.g.a.) con netta dermatosi da circa 30 giorni, ha provocato una intensa reazione congiuntivale con la seguente successione morbosa:
Dopo 1 ora: sensazione viva di bruciore con lieve iniezione congiuntivale che appena si differenziava dai controlli.
Dopo 5 ore: diminuzione del senso di bruciore ed aumento della reazione congiuntivale.
Dopo 24 ore: imponente reazione congiuntivale (forte iniezione vasale con aumento del calibro e dal numero dei capillari ed, in un caso, iniziale chemosi della congiuntiva bulbare).
Dopo 48 ore: senso di bruciore intenso, lacrimazione, fotofobia, arrossamento diffuso di tutte le sezioni congiuntivali ma sopratutto della congiuntiva bulbare, modica chemosi (accentuata invece nel caso sopra citato nel quale inoltre si poteva osservare la formazione di numerose piccole emorragie nel punto di iniezione e proliferazioni appena accenate, ad aspetto quasi flittenulare, della congiuntiva bulbare in corrispendenza del limbus).
Nessuna alterazione corneale alla lampada a fessura.
Tali alterazioni regredivano molto lentamente, per estinguersi nel periodo di 25—30 giorni.
Nei controlli sani, dopo un'iniziale lieve arrossamento congiuntivale nella sede dell'iniezione, alla distanza di 24 ore tutto era ritornato alla normaa.

Commento e conclusioni.

Come risulta dal complesso di ricerche da noi compiute e come era nostro intendimento dimostrare, assai differente è il comportamento dell'occhio all'introduzione dei dermatomiceti allorquando essi vengono inoculati in animali sani od in animali portatori di micosi sperimentale con stato allergico già sviluppato. Questo fatto era d'altra parte, entro certi limiti, da prevedersi tenendo presente quanto sappiamo succedere nelle dermatofizie sia spontanee che sperimentali.

Per quanto riguarda la congiuntiva, pur ricorrendo a varie modalità di introduzione del T.g.a. e del M.l., non abbiamo potuto dimostrare un potere patogeno di essi su questa membrana oculare. Non hanno infatti provocato nell'animale sano alterazione alcuna sia le instillazioni semplici che quelle precedute da tarsorrafia o scarificazione, come pure le iniezioni sottocongiuntivali. La lieve congiuntivite osservata in uno dei 3 conigli sani nei quali era stata praticata la tarsorrafia, non deve essere interpretata come tricofitica ma come un banale fatto irritativo, rapidamente scomparso non appena tolta la causa che l'aveva favorito (tarsorrafia).

Anche nell'animale in stato allergico, le instillazioni semplici non hanno provocato alcun processo morboso, mentre le instillazioni previa scarificazione hanno determinato una lieve e non costante reazione essenzialmente iperemica.

L'iniezione sottocongiuntivale generalmente sull'animale sano non ha provocato nessuna modificazione patologica; ricordiamo solo che in alcuni animali sani ed anche in altri portatori di tricofizia sperimentale, si è

avuta, in sede di inoculazione, la formazione di un granuloma i cui caratteri macro e microscopici, nonchè la sua relativa fugacità, ce lo hanno fatto interpretare come una reazione dei tessuti all'introduzione di materiale fungino non patogeno.

Nell'animale in stato allergico invece abbiamo visto comparire, assieme al granuloma od anche in assenza di esso, una pronta e costante reazione congiuntivale che nei giorni successivi assumeva l'aspetto di una vera e propria congiuntivite catarrale di media intensità. Tale congiuntivite non è da interpretarsi come provocata da un impianto diretto dei funghi sulla mucosa, ma è una reazione dell'organismo all'introduzione di materiale non patogeno per la congiuntiva, ma verso cui esso è allergizzato. In questo modo di vedere ci conforta l'assoluta mancanza di alterazioni congiuntivali dopo inoculazioni in animali sani ed in animali portatori di micosi cutanea con intradermoreazione alla tricofitina negativa, cosa che d'altra parte era logico attendersi dato lo spiccato tropismo dei dermatomiceti per i tessuti non vitali ed i validi poteri di difesa della congiuntiva verso i funghi in genere.

In base ai risultati da noi ottenuti sulla congiuntiva ed alle deduzioni patogenetiche che ne abbiamo poco sopra tratto, crediamo di poter giustamente interpretare alcune osservazioni di congiuntiviti comparse in corso di tricofizia ed il reperto isolato di Deuchler, brevemente riferiti nella parte introduttiva.

Le congiuntiviti croniche dal secreto delle quali Deuchler isolò il Tricophyton cerebriforme, sono da considerarsi forme essenzialmente irritative sia perchè non presentavano alcun particolare carattere e sia perchè, pur essendo bilaterali, in alcuni casi il fungo fu coltivato da un solo occhio; senza tener conto del fatto che tali reperti furono riscontrati solo nello spazio di un mese circa e mai nei successivi. L'A. stesso d'altra parte ammette questa possibilità.

La congiuntiviti descritte invece da Leszcynschi, Muende e Ruete, giustamente interpretate dagli AA., rappresentano una ben nota partecipazione delle mucose ad una tricofitide generalizzata. Già da tempo infatti Sutter, Sabouraud e Jadassohn hanno richiamato l'attenzione sugli e nantemi (mucosa boccale, vulvare e congiuntivale) che possono comparire in soggetti giovani, portatori di dermatomicosi, durante una micide cutanea generalizzata. Tra le mucose è proprio la congiuntivale quella che sembra essere più suscettibile a presentare manifestazioni di questo tipo. Anche a noi è occorso recentemente di osservare una intensa congiuntivite monolaterale in un giovane, affetto da kerion della nuca, che presentava una tricofitide generalizzata scarlattiniforme; in seguito ad un'iniezione di 0.4 cc. di tricofitina concentrata si osservò un aggravamento della congiuntivite preesistente ed una estensione del processo anche all'altro occhio.

Una congiuntivite allergica può comparire nel corso di dermatomicosi profonde senza che vi sia una contemporanea micide generalizzata. Ciò non pertanto tale congiuntivite deve essere interpretata come una micide isolata allorquando, essendo stata esclusa qualsiasi altra etiologia microbica, la tricofitina riveli uno stato allergico dell'organismo e provochi una reazione focale. In questo senso infatti è stata inquadrata la congiuntivite da uno di noi descritta e già citata nell'introduzione, insorta nel corso di una microsporia infiammatoria del dorso della mano. La frequente reazione congiuntivale che abbiamo sperimentalmente ottenuta con l'instilla-

zione di materiale ifomicetico, previa scarificazione della congiuntiva, e la costante e netta congiuntivite successiva all'introduzione dello stesso per via sottocongiuntivale nell'animale allergico, ci permettono di prospettare con una certa probabilità il meccanismo patogenetico di questa particolare forma. La maggior parte degli AA. pensano oggi che l'origine di una fitide generalizzata sia da ricercarsi nell'arrivo per via ematogena su cute allergica di elementi fungini e dello loro tossine; non è però esclusa, in particolari condizioni e nel caso di forme localizzate, la possibilità che i miceti e le loro tossine giungano per via esterna. Questo potrebbe essere a nostro aviso il meccanismo col quale si è prodotta la microsporide congiuntivale nel caso sopradetto: la bambina infatti, portatrice di forma infiammatoria al dorso della mano destra, con occasionali contatti tra focolaio primitivo e occhio omolaterale, può avere immesso ripetutamente nel sacco congiuntivale elementi fungini provocando la reazione della mucosa.

Anche il caso di Milian e Lelong potrebbe essere a nostro parere spiegato con questo meccanismo patogenetico, guì ancor più probabile poichè il focolaio infiammatorio primitivo si trovava sul bordo palpebrale.

Per quanto riguarda il potere patogeno dei dermatomiceti sulla c o r n e a i risultati delle nostre ricerche danno adito a qualche considerazione.

Le instillazoni previa scarificazione corneale in conigli sani non hanno provocato alcuna alterazione, così come era già stato osservatò da Jadassohn e Rehsteiner per l'Achorion nelle cavie; anche negli animali in stato allergico i risultati sono stati negativi.

Solo con una tecnica particolare quale è quella dell'l'iniezione intraparenchimale, abbiamo potuto determinare nella cornea alterazioni di una certa entità, mai riscontrate nei controlli inoculati con sospensioni sterilizzate in autoclave. Dobbiamo inoltre rilevare che solamente con il T.g.a. si sono ottenute tali lesioni corneali: siamo portati quindi a ritenere che questo micete abbia la capacità di permanere vitale per un certo periodo di tempo nel tessuto corneale provocandovi lesioni che vengono però in breve circoscritte ed in secondo tempo riparate.

Nel coniglio in stato allergico le stesse inoculazioni hanno provocato fatti reattivi molto più intensi ed uguali lesioni corneali che però andavano a guarigione più rapidamente.

Nelle inoculazioni in c a m e r a a n t e r i o r e mentre per l'animale sano non si è osservata alcuna apprezzabile alterazione riferibile al micete, nell'animale in stato allergico, come era prevedibile secondo quanto da noi illustrato per la congiuntiva, si è avuta una intensa reazione di tutto il segmento anteriore.

Riguardo alle iniezioni di sospensioni fungine nel v i t r e o dobbiamo ritenere che sia possible nei primissimi giorni dopo l'inoculazione una certa vitalità e forse anche crescita del micete (cultura positiva nel prelievo al 3° giorno e negativa al 10°). La stessa esperienza ripetuta nell'animale allergico, mentre non ha mostrato alcuna differenza nel quadro oftalmoscopico, determinava una reazione molto più accentuata del segmento anteriore.

Non abbiamo creduto opportuno eseguire le inoculazioni sul cristallino perchè la patogenicità dei dermatomiceti per esso è già stata ampiamente dimonstrata da Jadassohn e Rehsteiner e più recentemente confermata da Tamponi e Mecca.

Le esperienze compiute nella parte seconda sulle reazioni oculari alla tricofitina hanno confermato, in contrasto con le osservazioni di Sutter, le ricerche di Lombardo. Ricorrendo alle instillazioni non ci è mai riuscito di provocare una oftalmoreazione sia nell'animale che nell'uomo in stato allergico.

Solo con la tecnica dell'iniezione sottocongiuntivale, non praticata dai precedenti AA., abbiamo ottenuto nell'uno e nell'altro nette reazioni congiuntivali assai più spiccate in quest'ultimo. Nell'animale abbiamo proceduto anche all'iniezione intracorneale di tricofitina non ottenendo alcuna alterazione di questo tessuto, ma una congiuntivite reattiva di media intensità.

Le stesse inoculazioni, praticate nel coniglio e nell'uomo sani, non hanno mai provocato alcuna alterazione.

Autoriassunto.

Allo scopo di dare una giusta interpretazione alle supposte lesioni isolate della congiuntiva e del bulbo oculare da dermatomiceti ed a quelle che più frequentemente si vedono insorgere nel corso di micosi profonda cutanea (kerion), gli AA. hanno condotto una serie di ricerche nel coniglio sano ed in quello portatore di dermatomicosi sperimentale, al 6° ed al 25° giorno dall'innesto cutaneo e cioè in momenti differenti di stato allergico il cui sviluppo, nel coniglio, è stato da essi esattamente osservato e definito con esperienze preliminari. E' stato così esaminato il comportamento della congiuntiva, cornea, camera anteriore e vitreo in seguito all'introduzione, con varie modalità tecniche, di sospensioni di Trichophyton gypseum asteroides e di Microsporon lanosum.

Gli AA., non riconosciuto un vero potere patogeno di questi dermatomiceti per la congiuntiva e per le altre parti del bulbo (cristallino escluso), mettono in dubbio che le descritte manifestazioni isolate siano provocate da un diretto impianto dei funghi.

Confortati dai risultati ottenuti con l'inoculazione di materiale ifomicetico nella congiuntiva di animali in stato allergico, gli AA. interpretano tutte le congiuntiviti che compaiono talvolta nel corso di dermatomicosi profonde come una reazione di questo tessuto allergizzato dalla preesistente localizzazione cutanea del micete, reazione provocata dall'apporto di elementi ifomicetici figurati o di loro tossine, o per via ematica oppure talvolta, come nel caso particolare della congiuntiva, per via esterna.

Una oftalmoreazione nell'animale e nell'uomo in stato allergico non è stata riscontrata dagli AA. mediante l'instillazione di tricofitina concentrata; essa si verifica invece in modo netto e costante sia nel primo che nel secondo quando l'introduzione avviene per via sottocongiuntivale.

Summary.

In order to give a right interpretation to supposed isolated lesions of the conjunctiva and of the ocular globe caused by dermatophytes and to those that more frequently appear in the course of deep dermatophytosis (kerion), the AA. executed a series of researches on normal rabbit and on rabbit infected with experimental dermatomycose at the sixth and twentyfifth day after infection, that is in different moments of allergic state, the development of which, in the rabbit, as been exactly observed and established by them with preliminary experiences.

They examined in this manner the reaction of conjunctiva, cornea, anterior chamber and vitreous after inoculations, with various technic modalities, of suspensions of Trichophyton gypseum asteroides and Microsporon lanosum.

The AA. have not recognized a true pathogenic power of these dermatophytes against the conjunctiva and other parts of ocular globe (excluded crystalline) and they doubt that the described isolated manifestations are caused by a direct establishing of fungi.

Corroborated by results obtained with inoculation of fungous material into the conjunctiva of rabbits which had a developed sensitivity, the AA. interpret every conjunctivitis that sometimes appears in the course of deep dermatophytosis like a reaction of this tissue that is in allergic state for the preexistent cutaneous localisation of fungus, reaction caused by arrival of hyphomices or their toxins, or through the way of blood circulation or sometimes, as in particular case of conjunctiva, through externe way.

An oftalmic reaction in the animal and in the man that have a developed sensitivity, has not been observed by AA. by means of instillation of concentrated trichophytin; it instead appears clearly and constantly in both of them when introduction is made through subconjunctival way.

Bibliografia.

BEHDJET — Demat. Wochensch. 85, 29, 1029, 1927.
BLOCH — Hand. d. Haut u. G. Krank. gI, 300, 1928.
CAVALLERO — Mycopathologia III, 2, 14, 1941.
CAVARA — Le micosi oculari. Libreria Ed. Senese. Siena 1928.
DEUCHLER — Klin. Mbl. Aug. 85, 649, 1930.
FALCHI — Boll. Soc. Biol. Sper. I, V, 1926.
FAZAKAS — Orv. Hetil. 750, 1937 (censito su Zbl. O. 583, 1937).
FAZAKAS — Graefe Arch. 138, 416, 1938.
FISHER — Wien. Klin. Wochensch. 36, 720, 1923.
FOCOSI e ORZALESI — Boll. d'Ocul. 149, 1986.
GIARDINI e FARINA — Ann. d'Ott. 11, 690, 1946.
JADASSOHN — Dermatologie: Trichophytide 669, 1938.
JADASSOHN e REHSTEINER — Klin. Mbl. Aug. 85, 280, 1930.
LESZCYNSKI — Ann. de Derm. et de Syph. 536, 1923.
LOMBARDO — Boll. Sec. Med. Chir. Modena. 1910—1911 (Censito du Giorn. It. Mal. Ven. 335, 1911)
MACHEK — Lwow Tygodnik lek. 45, 1912 (Cit. da Cavara).
MC HARDY — T.O.S. V, 42, 1885 (Cit. da Duke—Elder, Text Book of Ophth. II, 664, 1938.
MECCA — Ann. d'Ott. 66, 481, 1938.
MILIAN e LELONG — Bull. de Dermat. et Syph. 25, 1923.
MUENDE — Brit. J. of Dermat. 26, 1930.
NEMETH — Klin. Mbl. Aug. 106, 714, 1941.
PIGNOT — Bull. Soc. Fr. Derm. 37, 7, 1109, 1930.
RAMPOLDI — Ann. d'Ott. 11, 517, 1882.
RUETE — Z. Art. For. 27, 649, 1930. (Censito in Zbl. O. 37, 85, 1931).
SUTTER — Arch. Derm. und Syph. 127, 735, L 919.
TAMPONI e MECCA — Boll. Sez. Reg. Soc. It. Derm. e Sig. 16, 3, 1937.

Comportamento dei Blastomiceti di fronte al metodo di colorazione proposto da Dold

di

P. Cipriani

(dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università di Firenze)

(20-12-1946)

Nel 1932 Dold propose un nuovo metodo di colorazione verso il quale le varie specie microbiche si comportavano in modo diverso, come si verifica con il metodo di colorazione di Gram da tempo usato nella tecnica e nella diagnostica degli Schizomiceti.

Il metodo di Dold consiste, brevemente, nel fissare e mordenzare il preparato con acido fenico e iodio; indi colorare con verde di anilina usandosi a contrasto il bruno Bismarck. La differenziazione viene effettuata con alcole ureato.

I batteri Gram-negativi rimangono Dold-negativi, ossia presentano una colorazione bruna con il metodo di Dold. I batteri Gram-positivi si dividono in quattro gruppi: batteri Dold-positivi che restano colorati in verde; batteri Dold-negativi che si colorano in giallo bruno; batteri a comportamento incostante; batteri infine che passano da una fase all'altra con il susseguirsi dei trapianti.

Prendendo in particolare esame questo nuovo metodo di colorazione, ho recentemente esteso le richerche di Dold ad un certo numero di Schizomiceti e siccome lo stesso Dold saggiò il suo metodo su due o tre specie di Blastomiceti, allargai le mie ricerche anche su questo gruppo di microrganismi includendovi un artrosporeo tipico quale il *Geotrichum candidum*.

Contrariamente a quanto verificasi con la colorazione del Gram per cui i Blastomiceti presentano promiscuamente cellule Gram-positive e cellule Gram-negative, e contrariamente a quanto verificasi nei batteri sia di fronte al metodo di Gram come a quello di Dold (Gram- e Dold-resistenza), trovai che i Blastomiceti esaminati e precisamente *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces ellipsoideus, Torulaspora rosei, Rhodotorula* sp. *Torulopsis* sp., si presentano sempre Dold-positivi. Solo in *Geotrichum candidum* osservai che mentre i filamenti micelici apparivano prevalentemente Dold-positivi e Gram-negativi, le artrospore (il cui comportamento al Gram appariva incerto) si mostrarono prevalentemente Dold-negative.

Dato che la Gram-resistenza risulta influenzata, come è noto da un complesso di fattori relativi all'età della coltura, al mezzo alimentare, allo stato di fase, al tempo di decolorazione, ecc. ho voluto vedere se qualche fattore esterno avesse del pari influenza sulla colorazione di Dold. Mi sono limitato, per il momento, ad osservare se e come poteva influire il

mezzo alimentare e l'età delle colture. A questo scopo ho coltivato le specie già ricordate, alle quali ho aggiunto altri due stipiti di *Saccharomyces ellipsoideus, Torulopsis candida, Mycoderma cerevisiae, Candida albicans,* nei seguenti substrati:

A) Substrati liquidi.
1) infuso di malto
2) Liquido sintetico N. 1

acqua	cc	1000
fosfato ammonico	gr	5
acido tartarico	„	2
solfato di magnesio	„	0.3
fosfato di potassio	„	3
glucosio	„	20

3) Liquido sintetico N. 2

acqua	cc	1000
fosfato di potassio	gr	1
solfato di calcio	„	1
acido tartarico	„	1
asparagina	„	2
glucosio	„	20

4) infuso di fagioli saccarosato al 20 %.

B) Substrati solidi
5) agar-malto
6) gelatina di mosto d'uva
7) agar-fagioli
8) agar Sabouraud

Tutte le colture furono tenute a 24° C. circa e le osservazio ni furono eseguite su colture di 48 ore e quindi di 15 giorni e 30 giorni di età. In ogni caso non fu registrata nessuna differenza note vole nei riguardi del mezzo alimentare, nè dell'età delle colture. Sempre, le specie cimentate, si sono dimostrate Dold-positive salvo le artrospore di *Geotrichum candidum,* come sopra si è ricordato.

In conclusione, il metodo di colorazione di DOLD applicato ai Blastomiceti ha dato sempre reperto positivo. Tale reperto non risulta influenzato dalla natura e composizione del mezzo alimentare nè dall'età della coltura. Contrasta il fatto che mentre rispetto a tale metodo di colorazione i Batteri dimostrano una grande varietà di comportamento, i Blastomiceti presentano un comportamento quanto mai omogeneo quale non presentano, ad es. rispetto alla colorazione di Gram. Sulle cause di tale diverso comportamento, certo legate alla reattività del citoplasma e alla costituzione istochimica delle specie appartenenti ai due gruppi, resta da indagare.

Summary

Dold's staining method applied to blastomycetes has always allowed a positive observation. Into this finding interferes neither the nature and composition of the nutritive medium, nor the age of cultures. As a

contrast was detected the fact that while the bacteria yelded by the aforesaid staining method demonstrate large differences in their behaviour, Blastomycetes show a closely homogenous behaviour, which fact does not happen, for instance, using the Gram stain. The causes responsible for such a different behaviour, doubtlessly connected with the protoplasmic reactivity and the cytochemical composition of the species belonging to the different-groups, are yet a matter of study.

Bibliografia

DOLD H., Centr. f. Bakter., I, vol. CXXIV, p. 220, 1932. — CASTELLI T., Boll. Istit. Sierot. Milanese, 1931.

Bibliographia Mycopathologica

1942-1944

ACANFORA G., Azione di alcune irradiazioni sullo sviluppo di un gruppo di miceti. Ann. Med. Nav. e Colon., *41,* vol. 1, (3—4), 193—202, 6 fig., 1935.

ACANFORA G., Sull'azione di alcune sostanze colloidali sullo sviluppo di un gruppo di funghi dei generi *Monilia* e *Cryptococcus*. Ann. Med. Nav. e Colon., *41,* vol. 2°, (5—6), 779—790, 1935.

ALSTON J. M., Crude penicillin filtrate for focal treatment. Brit. Med. J., (4349), 654—656, 1944.

ALVAREZ G., Algunas consideraciones sobre el verdadero pie de atleta o epidermoficia interdigital. Bol. Soc. de Derm. y Sifil., Assoc. Med. argentina, *7,* 190—203, (1941), 1942.

ALVAREZ G. y VERGNOLLE M. J., Epidermomicosis acromiante vitiligoide, producida por un *Penicillium*. Bol. Soc. Derm. y Sifil., Assoc. Med. argentina, *4 e 5,* 294—299, 7 fig., 1940.

AMALFITANO G., La Criptococcosis epidermica di Castellani. Giorn. Ital. Dermat. Sifil., *83,* (3), 446—452, 4 fig., 1942.

ARDIAS A., Kerion Celsi da *Trichophyton niveum* del cuoio capelluto. Rass. Intern. Clin. Ter., *23,* (7), 190—195, 2 fig., 1942.

ARGENZIANO G., Sul potere antiifomicetico del tri-bromo-etanolo (Avertina). La Riforma medica, *58,* (28), 866, 1942.

ARNAUDI C., CORBERI E. e SOARES RODRIGUES H., Ricerche microbiologiche sui formaggi italiani. I°: Osservazioni sul quartirolo di monte. Ann. di Microb., *1,* (3), 153, 1941. *(Oospora crustacea* (Bull). Sacc.)

AUSTER L. S., Actinomycosis. A review of the subject with detailed clinical and reports of one case of the intestinal and ovarian form. Amer. J. Clin. Path., *10,* (9), 652—665, 4 figs., 1940.

BALDACCI E., Contributo alla sistematica degli Attinomiceti. IX: Saggio di classificazione e critica al concetto di spora degli Actinomycetales. Atti Istit. Bot. Univ. di Pavia, serie IV, *13,* 99—129, 1941.

BALDACCI E., Concetto e definizione di spora negli Attinomiceti. Nuovo Giorn. Bot. ital., n.s., *48,* (3—4), 677—680, 1941.

BALDACCI E., La moderna sistematica degli Attinomiceti. Giorn. Batt. e Immun., *28,* (4), 457—477, 1942.

BARBONI E., Rapporti fra dissociazione del bact. rusiopatico e patogenesi delle lesioni cardiache dei suini morti di mal rossino. La nuova veterinaria, *19,* (9), 14—18, 1941.

BARCHIESI A., Recenti vedute sull'actinomicosi con descrizione di un caso clinico. Folia Medica, *26,* (18), 741—750, 1940.

BARCHIESI A., Ricerche sulla fermentazione simbiotica del Castellani. Ann. d'Igiene, *51,* (3), 160, 1941.

BARCHIESI A., Le sepsi. XXI: Sepsi da miceti. Arch. Ital. Sc. Med. e Colon. 1942.

BARIATTI R., Micosi spleniche (da *Actinomyces sulfureus)* (ricerche sperimentali). Arch. Ital. di Chir., *59,* (5—6), 1941.

BARKE A., Aktinomykose bei einem Hunde. Dtsch. tierärtl. Wschr., (23), 281, 1941.

BARNSHAW H. D. a. READ W. T. Jr., Rhinosporidiosis of the conjunctiva. Arch. Ophthalm. *24,* (2), 357—361, 2 figs., 1940.

BATT F., Aspergillosis other mycoses in the sinuses of the nose. Acta oto-laryng., (Stockholm), *39,* (2), 129.

BENEDETTI G., Reticolo-istiocitosi sistematica da *Mycocandida pseudo*-tropicalis. Lo Sperimentale, *95,* (3), pp. 43, 26 figg., 1941.

BLUMEL P., Die primäre Strahlenpilzerkrankung des Penis. Zbl. Chir., (13), 454, 1943.

BONNET—ROY *F.*, A propos de trois cas d'actinomykose cervico-faciale. C.r. d'Odont., 35, 1941.

BORSOTTI *P. C.*, Asociazioni micetiche nella tubercolosi polmonare cavitaria. Ricerche su cadaveri e ricerche sperimentali su animali. La med. contemp., *2,* 1936.

BRUNO F., Actinomicosi polmonare associata ad epato-splenomegalia. Il Policlinico, sez. med., *49,* (10), 317—332, 1942.

BUENGELER W., Ueber die brasilianische Blastomykose und den histologischen Nachweis der *Paracoccidioides brasiliensis.* Virchw's Arch., *309,* (1), 76—86, 1942.

BUSH J., Severe generalized blastomycetic dermatitis. Report of Case. Arch. of Dermat. *43,* (1), 485, 1941.

CARBONCINI A., Sepsi lenta endocarditica da Actinomicetacea a particolare aspetto coccoide polimorfo. Significato e valore diagnostico di tale variazione morfologica. Giorn. di Clin. Med., 30 agosto 1943.

CARDIA A., Un caso di micosi chirurgica (da *Sterigmatocystis nigra).* Rass. Med. Sarda (Cagliari) *42,* (8—9), 246, 1940.

CARDIA A., Su di un caso di sporotricosi cutanea. La Med. contemp., *8,* (3), 61—66, 4 figg., 1942.

CARLINFANTI E., DE BARBIERI A. e SPIGA A., Ricerche sulle sostanze ad azione antibatterica nelle culture di penicilli e di aspergilli. Boll. Istit. Sierot. Milanese, *23,* 18—19, 1944.

CARRIE C. u. ZANTOPF H., Ueber das Vorkommen der Epidermophytia interdigitalis bei Berleuten. Dermat. Wschr., *112,* 315, 1941.

CARUSELLI M., Miceti e agglutinine. Osservazioni sulla *Monilia balcanica* Cast. Ann. d'Igiene, *51,* (6), 404—406, 1941.

CASTELLANI A., Dermatite exematosa micotica delle dita dei piedi dovuta probabilmente al *Geotrichum rotundatum* Cast. 1911 ed al *G. rotundatum* var *anglicum* n. var. Arch., ital. sci. med. colon. e di parasit., *23,* (1), 1—6, 4 figg., 1942.

CASTELLANI A. e URSO B., Breve nota su alcuni liquidi dissolventi gli epiteli e contemporaneamente coloranti i miceti presenti in essi. Med. trop. e subtrop., *1,* (5), 129—131, 1941.

CASTELLI T., Indagini chimiche sui Blastomiceti. Ann. Micr., *1,* (6), 269, 1941.

CASTELLI T., Temperatura e chimismo dei Blastomiceti. Ann. Micr., *2,* (1), 8, 1941.

CARPANETO A., Granuloma encefalico da ifomicete demaziaceo. Pathologica, *35,* (624—625), 233—258, 20 figg., 1943.

CIFERRI R., La dissociazione dei lieviti. Trattato di Enologia di P. C. Garoglio, vol. II, Ed. Progresso vinicolo ed oleario, Firenze, 1941.

Ciferri R., Diffusione e ciclo dei lieviti in natura. Trattato di Enologia di P. C. Garoglio, vol. II, Ed. Progresso vinicolo ed oleario, Firenze, 1941.

Ciferri R. e Verona O., Descrizione dei lieviti delle uve, dei mosti e dei vini. Trattato di Enologia di P. C. Garoglio, vol. II, Ed. Progresso vinicolo ed oleario, Firenze, 1941.

Ciferri R., Redaelli P. e Domenici F., La microflora del cadavere umano. Att. Istit. Bot. Univ. di Pavia, serie 5⁰, *3,* (2), 95—135, 15 tav., 1943.

Cirenei A., Contributo allo studio di una micosi granulomatosa (coccidioidomicosi). Arch. med. sperim., *9,* 641—664; 13 fig., 1941.

Colonnello F., Il sognificato biologico e patologico di alcuni miceti lievitiformi nell'ambito instestinale dell'uomo. Riv. Clin. Pediatrica, *41,* (9), 473—488, 1943.

Coggi G., Prime esperienze cliniche sull'uso locale della penicillina. Boll. Istit. Sierot. Milan., *23,* 20—29, 1944.

Cronkite A. E. a. Lack A. R., Primary pulmonary coccidioidomycosis. J. exper. Med., *72,* (2), 167, 1940.

Daffas J., Mycoses et cancer du larynx. Rev. de Laryng., *60,* 522, 1939.

D'agata A., Ricerche sperimentali sull'osteotropismo dei miceti *(Sporotrichum Beurmanni)* Arch. Ital. med. sperim., *8,* (6),321—340, 14 figg. 1941.

Danbult N., Silver forces as source of infection with trichophytia in man. Veter. J., *95,* 326, 1939.

De Gaudenzi C., Su un raro reperto di micosi cutanea. Dermatomicosi da *Aspergillus fumigatus* Fres. Il Dermosifilografo, *16,* (5), 239—250, 2 figg., 1941.

De Jong J. J. u. Zeldenrust J., Actinomykose von Herz und Lungen. Nederl. Tijdschr. Geneesk., 29.11.1941.

Del Guasta F., Sporotricosi cutanea a gomme ipodermiche (prima osservazione in provincia d'Arezzo). Arch. Ital. dermat. e Sifil., *16,* (3), 193—211, 8 figg., 1940.

Delitsch H., Die pathogenen Eumycete. Vorratspflege und Lebensmittelforschung, *5,* (7—9), 281—292, 17 figg., 1942.

Dell'acqua A., Endocardite actinomicotica in morbo di Roger. Bull. Sc. Mediche, *112,* (5), 488, 1940.

Dell'acqua A., Endocardite actinomicosica *(Actinomyces albus).* Klin. Wochschr., (5), 100, 1943.

Del Vecchio P., Sopra un caso di streptotricosi del polmone. Ann. Med. Nav. e Colon., *44,* (3—4), 126—128, 1938.

Demel R., Ein Beitrag zur Klinik der Streptotrichose. Zbl. Chir., (12), 490, 1942.

De Muro P. e Magrassi F., Su un caso di granuloma perirenale neoplastiforme di probabile origine micotica. Policlinico (sez. med.), *48,* (3), pp. 8, 4 figg., 1941.

Dorling G. C. u. Eckhoft M. L., Chemotherapie der abdominalen Aktinomykose. Lancet, 7.12.1940.

Dosa A., Ein Fall von Blastomycosis verrucosa. Dermat., Wschr., (7) 127, 1941.

Dosch H., Mikroskopische und kulturelle Untersuchungen von Pilzen die aus sogenannten Stockflecken einer Baumwollgewebes gezüchtet wurden. Wien. med. Gesell. (Pathol. Anat.), 8 dicembre 1942.

DUETTMANN G., Aktinomykose der Querkolons mit Durchbruch in den Magen. Zbl. Chir., (93), 581, 1941.

DURHAM O. C., Atmospheric allergens in Alaska. J. of Allergy, *12,* (3), 307—309, 1941. (*Penicillium, Alternaria, Hormodendron).*

DWISCHKOW P. P., Leichenmikroflora. Russ. Arch. pathol. Anat. u pathol. Physiol., *4,* (4), 99, 1938 (in russo).

ECKHOFT M. L., Aktinomykose des zentralen Nervensystems. Lancet, *4,* 7, 1941.

EIKEN A. T., La pseudo-actinomicosi. Egeskrift for Laeger, N. 25, 1941.

EMMONS C. W., a.coll., Chromoblastomycosis. J. Amer. Med. Assoc., *116,* (1), 1941.

FALCHETTI G., La sporotricosi nella pratica medica. Gazz. Osped. e Clin., *9,* (28), 673—676, 1939.

FANCONI G., Ein Fall von Lungenaktinomykose im fistulösen Stadium, geheilt durch protrahierte Sulfamidotherapie. Schweiz. med. Wsch. (7), 175, 1943.

FARNESS O. J., Coccidioidose infection in a dog. J. Amer. Vet. Med. Assoc., *9,* (762), 263—264, 2 figg., 1940.

FAZAKAS A., Ueber Pilzerkrankungen der Hornhaut. Klin. Augenheilk., *106,* (1), 56, 1941.

FOLTZ P., Alterazioni anatomo-patologiche del polmone da *Monilia (Candida).* Giorn. Accad. med. di Torino, *46,* 1933.

FOLTZ P., Forme anatomiche e patogenesi dell'actinomicosi polmonare. Giorn. Accad. Med. di Torino, *46,* 1933.

FOLTZ P., Su la bronco-pneumo-moniliasi. Riv. Clin. Med., 1933.

FOLTZ P. e CANAVERO G., Su l'actinomicosi polmonare e toracica. Arch. Ital. Chir., 1933.

FREHEN T. D., Una cura delle infezioni micosiche superficiali della cute glabra. J. Amer. Med. Assoc., *111,* 685, 1938.

FROSINI D., Reperto di forme giganti di *Blastocystis.* Pathologica, *33,* (598), 284—285, 1941.

GALEOTTI FLORI A., Il mughetto degli immaturi. Boll. Soc. ital. di Pediatria, *9,* (1), 50—51, 1940.

GAROGLIO P. G. e Coll., Trattato di Enologia (Enciclopedia viti-vinicola moderna in cinque volumi). Vol. II, pp. 723, molte figg., grafici, tavole. Ed. il Progresso vinicolo e oleario, Firenze, 1941. (dedicato particolarmente ai lieviti).

GAROGLIO P. G. e CIFERRI R., La moltiplicazione dei lieviti e le leggi che la regolano. Trattato di Enologia di P. G. Garoglio, Vol. II, Ed. Progre. vinicolo ed oleario, Firenze, 1941.

GASTINAU F. M., SPOLYAR L. W. a. Haynes E., Sporotrichose. J. Amer. Med. Assoc., *117,* 13, 1941.

GINOULHIAC R., Micosi polmonare (e dermatofizia) da *Mycotorula.* Clin. Med., N. 37, 18 agosto 1943.

GIORNELLI L., Maduromicosi autoctona dell'agro perugino da una nuova *Glenospora* (*Glenospora viridobrunnea* Red. et Cif.). Ann. Fac. med. e chir. di Perugia, *40,* (2), 9—19, 5 figg., 1942.

GOEDENY A., Pathogene Aktinomyzestämme. Dermat. Woschr., (4), 76, 1942.

GRAFFI A., Benzopyrenspeicherungenversuche an Hefezellen. Z. f. Krebsforsch., *52,* (3), 234, 1941.

GRAHAM P. v., Solitary gommatous Sporotrichosis of two years duration. Arch. of Dermat., *43,* (5), 865, 1941.

GRANCINI E. L., L'impiego della penicillina in terapia oculistica. Boll. Istit. Sierot. Milanese, *23,* 30—34, 1944.

GOTTSCHALK A., Kinetics of fermentations of d-Fructofuranose by Yeasts. Austr. J. exper. Biol. a. Med. Sci., *22,* 291, 1944.

GRECO N. V., Sobre la enfermedad (sarcoma idiopatico multiple hemorragico) de Kaposi. La Semana Médica, *46,* (10), 524, 1939.

GRECO N. V., Demonstracion del *Cryptococcus haematicon* en un nuevo caso de sarcomatosis de Kaposi. Boll. de la Soc. de Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5,* 357—365, 10 figg. (1939), 1940.

GRECO N. V., Caracteristicas del hongo patogeno productor de la enfermedad (sarcomatosis) de Kaposi observadas en dos neevos casos. Bol. de la Soc. Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4 e 5,* 93—140, 36 figg., 1940.

GRECO N. V., Un segundo caso familiar de enfermedad (sarcomatosis) de Kaposi con el hongo pathogeno especifico, el *Cryptococcus haematicon.* Bol. de la Soc. Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5,* 200—219, 17 figg., 1940.

GRECO N. V., Etiologia de la enfermedad de Schamberg observada en un caso. Bol. de la Soc. Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5,* 244—268, 17 figg., 1940. *(Cryptococcus haematicon* Greco).

GRECO N. V., Localizacion anomala de enfermedad de Kaposi (sarcoma idiopatico multiple hemorragico) diagnosticada investigando el *Cryptococcus haematicon* en la sangre. Bol. de la Soc. de Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5,* 281—293, 13 figg., 1940.

GRECO N. V., BIGATTI A, *Santiago Ponce de Leon* y CAPURRO J., Localizacion anomala de enfermedad de Kaposi (sarcoma idiopatico multiple hemorragico) diagnosticada investigando el *Cryptococcus haematicon* en la sangre. La Semana Medica, *46,* (4), 173, 1939; Rev. de la Asoc. Med. argentina, *52,* 1939.

GROSS H., Odontogene Aktinomykose. Dtsch. zahnärtl. Wschr., (24), 323, 1942.

GRUENINGER W., Penicillin. Med. Verlag H. Huber, Bern, pp. 168, 1944.

GRUBER W. H., Haematogenen-metastatische Lungenaktinomykose. Wien. klin. Wschr., (6), 117, 1942.

GRYTHE O., The actinomycetes and their occurrence in soil and in the organisms of warm-blooded animals. Acta odont. scandinav., *1,* (2), 155, 1939.

GRYTHE O., Die Aktinomyceten, ihr Vorkommen in Boden, im Körper der Warmblüter. Deutsch. Zahn-Mund-Kieferheilk., *8,* (1), 29, 1941.

GUERRINI G., Azione delle radiazioni luminose sull'indice vitale dei saccaromiceti. Lo Sperimentale, *95,* (1), 1—9, 1941.

GUNCHE F. F., MOSTO D. y JAPALUCCI L., Granuloma paracoccidioide (Blastomicosis) de Almeida. Bol. Soc. Derm. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5,* 156, 13 figg., 1940.

HAFSTROEM T., SJOQUIST O. u. HENSCHEN F., Zur Kenntnis der mykotischen Veränderungen des Gehirns. Acta chir. scand., *85,* (1/3), 115, 1941.

HARRIS L. H., Experimental reproduction of respiratory mold allergy. J. of Allergy, *12,* (3), 279—289, 1941. *(Alternaria, Aspergillus).*

HASSIN G. B., Giant Cells in some forms of acute meningitis including the coccidioid form. J. nerv. Dis., *93*, (1), 74, 1941.

HIGUTI K., Ueber die oberflächlichen Blastomykosen der Haut. I. Mitt.: Klinische Beobachtungen. Japan. J. of Dermat., *43*, 256—280 (japanisch), 65—66 (deutsch), 1938.

HIGUTI K., Ueber die oberflächlichen Blastomykosen der Haut. II. Mitt.: Mykologische Untersuchungen. Japan. J. of Dermat., *43*, 563—588 (japanisch), 112—113 (deutsch), 1938.

HIGUTI K., Vergleichende Untersuchung ueber die in Speichel und Kot vorkommenden Hefen bei Mutter und Kind. Hifu. Hinyô, *6*, 19—26 (japanisch), 6 (deutsch), 1938.

HIGUTI K., Einfluss der Farbstoffe auf Hefe. Japan. J. of Dermat., *45*, 455—483 (japanisch), 125 (deutsch), 1939.

HIPPEN, Trichophytia crustosa et profunda. Dtsch. tierärtl. Wschr., (36), 483, 1941.

HOF T., On the identity of *Torula cremoris* Hammer et Cordes with *Candida pseudotropicalis* (Cast.) Basgal., Ann. v. Leeuvenhoek, *9*, 1943. ✓ done. 1947

HOLLAENDER A., COLE P. A. a. BROCKETT F. S., Absorption and Fluorescence Spectra in Relation to the photoletal Action of Methylcolantrene on Yeasts. The Am. J. of Cancer, *37*, (2), 265—272, 1939.

HOWELL A. Jr., Studies on Histoplasma capsulatum and similar form-species. III: Effect of hydrogenion concentration. Mycol., *33*, (1), 103—117, 1941.

IMAI K., Ueber die Hefen der klinisch gesunden und erkrankten Haut. Hifu. Hinyô, *6*, 27—32 (japanisch), 7 (deutsch), 1938.

JAPANESE JOURNAL of MED. SCI., Part. XIII, Dermatology and Urology, vol. II, N. 2, 1941, Abstracts of Dermat. Venereol. a. Urological Papers, Dermatomycosis, 12—13.

JONQUIERES E., Pie de Madura (paramicetoma) Bol. Soc. Dermat. y Sifil., Asoc. med. argentina, *4* e *5* 399—404, 4 fig. (1939), 1940.

JONQUIERES E., Blastomicosis cutanea *(Monilia?)*. Bol. Soc. de Dermat. y Sifil., Asoc. med. argentina, *6*, 97—101, 1 fig., (1940), 1941.

JONQUIERES E., Dermatosis micotica. Bol. Soc. Dermat. y Sifil., Asoc. Med. argentina, *6*, 155—157, (1940), 1941.

JONQUIERES E. y Grillo A., Un caso de piedra negra (Tricomicosis). Bol. Soc. de Dermat. y Sifil., Asoc. med. argentina, *7*, 165—171, 1 fig., (1941), 1942.

JOHNSTONE K. I., Une simple technique de culture monocellulaire. J. of Path. a. Bact., 159—163, 2 Aprile 1943.

KAMBAYASHI T., Micose Posadas-Wernicke. Rinsho, Hifu, *3*, 227, 1938.

KANOCZ D. u. KUCHARIK J., Zwei Fälle von Blastomykosis. Orvostudomànyi Közlemények, (4), 94, 1940.

KIESE M., Chemiotherapie mit antibakteriellen Stoffen aus niederen Pilzen und Bakterien. Klin. Wschr., (32—33), 505—511, 1943.

KIHARA M., Ein Fall von Sporotrichose. Hifu. Hinyô *2*, 249—254 (japanisch), 12—13 (deutsch), 1939.

KREMBS J., Einige seltenere Krankheiten des Wildes (austeckende Hornhautentzündung, Schimmelpilzerkr., etc.). Arch. Tierheilk., *75*, 461, 1940.

KRUMDIECK N. a. STEVENSON L., Spinal epidural abscess associated with actinomycosis. Arch. of Pathol., *30*, (6).

KUGELMEIER L. M., Ueber primäre Lungenaktinomykose. Hippokrates, (7), 141, 1941.

KUWANO Y u. HARA Y., Ueber die Trichophytie und ihre Erreger in Kyûsyû. Hifu. Hinyô, *8*, 106—114 (japanisch), 10 (deutsch), 1940.

LANDY L., Beitrage zur Aspergillose der Rebhühner. Közlemenyek az összehasonlitó élet-és Kortan Köreböl. *27*, 9, 1940 (ungherese).

LAMPE P. H. J., Over piedra en het voorkomen van piedra te Batavia. Geneesk. Tijdschr. Ned.-Indië, *80*, (25), 1515—1525, 1940.

LENGYEL L., Beiträge zur pathologische Histologie der Aktinomykose. Közlemények az összehansonlitó élet-és Kortan Köréböl, *29*, 1, 1940.

MANCA C., Su di un caso di actinomicosi primitiva del polmone da *Actinomyces asteroides* Eppinger (Streptotricosi polmonare). Giorn. Accad. Med. di Torino, *47*, 1934.

MANNINI R., Infezione malrossinica umana in lesioni traumatiche della cute. Atti R. Accad. Fisiocritici, Siena, *9*, (6), 173, 1941.

MARZOLLO, Considerazioni patogenetiche in relazione ad un caso di kerion tricofitico con emocultura positiva. Il Dermosifilografo, (11), 586, 1941.

MARZOLLO, Le alterazioni inguinali causate dagli adelosaccaromiceti. Il Dermosifilografo, *17*, (5), 241, 1942.

MATTHIAS D., Akropachie beim Reh infolge Mykose. Berl. u. Münch. tierärtl. Wschr., (27), 372, 1941.

MINICUCCI P., Micosi intestinale da *Monilia enterica* Cast. Il Policlinico, *48*, (28) 1237, 1941.

MOLINARI G., Meningite da *Torula*. La riforma medica, *56*, (31), 984, 1940.

MONACELLI M., Note ed osservazioni su le epidermofizie. Ann. med. nav. e colon., *49*, (1—2), 3—16, 8 figg., 1943.

MORANDINI N., Contributo allo studio delle micosi umane: rarissimo caso di pericardite acuta actinomicotica. Clin. Med., (33), 18 agosto 1943.

MARIANI P. L., Ricerche sperimentali intorno ad alcune alghe parassite dell'uomo *(Prototheca portoricensis* var. *trispora* Ashf. Cif. et Dalmau). Boll. Soc. Ital. Microbiol., (9—12), 1942.

MORETTI J., Sopra due casi di contagio umano da mal rosso dei suini. La nuova Veterinaria, *20*, (2), 11—13, 1941.

MORONE C., Contributo allo studio del potere patogeno del *Penicillium lilacinum* Thom., Giorn. Batt. e Immun., *30*, (3), 316—330, 4 figg.

MUMME C., Zur Klinik und Pathologie der Blastomykosen des Zentralnervensystems. Münch. med. Wschr., (7), 138, 1943; Med. Klin., (7), 134, 1943.

MUSCOLINO S., Su alcuni casi di farcino criptococcico osservati nell'asino a Messina. L'azione veterinaria, *8*, (8), 240—245; 2 figg., 1939.

NARDONE B., Sindrome pseudotubercolare pneumomicotia da *Cohnistreptothrix* Arch. ital. Med. sperim., *11*, 289—302, 3 figg., 1942.

NASSI L., Studio clinico e batteriologico sopra un particolare caso di meningo-encefalite purulenta da streptotricea, insorta in una bambina con pertosse in atto e di recente vaccinata contro il vaiolo. Il Lattante, *12*, (11), 555—558, 9 figg. 1941.

NEEB H., Bijdrage tot de therapie van de tinea imbricata. Geneesk. Tijdsch. Ned.-Indië, *80*, (28), 1707—1710, 1940.

NEGRONI P., Estudio micologico del premier caso sud-americano de histoplasmosis. Rev. Inst. Bacter. (D.N.H.), *9*, (3), 239—294, 15 figg., 1940.

NEGRONI P., Transformacion „in vitro" del Rhinocladium Schenki en un cultivo levuriforme. Sus caracteres micologicos. Rev. argent. de Dermat., *24*, 4º parte, 1940.

NEGRONI P., Reproduccion experimental de la alopecia parvimaculata en la cavia. Rev. argent. de Dermat., *24*, 4º parte, 1940. *(Trichophyton gypseum, Achorion quinqueanum).*

NEGRONI P. y ABERASTURY M., Alopecia parvimaculata de origen tricofitico. Rev. argentina de Dermat., *24*, 4º parte, 1940.

NEGRONI P. y BLAISTEN R., *Prototheca Ciferrii* n. sp. Negroni et Blaisten. Rev. del Instit. Bacter. (D.N.H.), *9*, (3), 344—359, 2 figg., 1940.

NEGRONI P. y FISCHER I., Flora micológica (Eumycetes) de las materias fecales. Rev. Inst. Bacter., (D.N.H.), *9*, (3), 305—328, 14 figg., 1940. *(Candida, Geotrichum, G. Redaellii* n. sp. Negr. et Fisch., *Aspergillus, Mucor, Saccharomyces, Penicillium, Rhodotorula, Pichia farinosa* var. *galerus* Negr. et Fisch., *Saccharomyces Chodati* var. *Lodderi* Negr. et Fisch.

NEGRONI P. y FISCHER I., Ensayo sobre la biologia de *Vohlkampfia debilis* Jollos 1917, amoeba parásita de una levadura y fenomenos de lisis semejante a la bacteriofagia. La Prensa med. argentina, *28*, (5), pp. 58, 7 figg., 1941.

NEGRONI P. y LASTRA T. de V., Micosis generalizada y mortal por *Trichosporon proteolyticum* n. sp. Rev. Inst. Bacter., *8*, (5), 455—471, 9 figg., 1939.

NEGRONI P., PIERINI L. E., y CORDERO A., Alopecia parvimaculata de origin microscorico. Rev. argent. de Dermat., *24*, 3º parte, 250—260, 1940.

NEGRONI P. y QUIROGA M. I., Manifestaciones alergicas con el aspecto clinico de la pitiriasis marginada y circinada de Vidal. Rev. argent. de Dermat., *24*, 2º parte, 155—159, 1940.

NEGRONI P. y TEY J. A., Estudio micologico del primer caso argentino de micetoma maduromicosico de granos negros. Rev. Inst. Bacter., *9*, (2), 176—185, 6 figg., 1939.

NIÑO F. L., PONS L. M. y GAY A. E., Granuloma paracoccidioidico de localizacion laringea. Bol. Inst. Clin. Quir., Buenos Aires, Gennaio 1941.

NOMURA H., Biologische und tierexperimentelle Untersuchungen ueber menschenpathogene Trichosporonarten und einige ihren nahe stehende Hyphomyceten. Tôhoku Ig. Z., 25, 1939.

NOTTEBOHM T. y NEGRONI P., Queilitis por *Candida suaveolens* (Lindner) Ciferri. Rev. argent. de Dermat., *24*, 3º parte, 3—7, 1 fig., 1940.

OLAH, Una nuova malattia della cute e dei peli condizionata da funghi. Dermat. Wschr., 7 agosto 1943.

OCHI S., Ein Fall von Pityriasis versicolor im Gesicht. Hifu. K., *32*, 229—230, 1938.

OKAMURA T., Zwei Arten von Nagelmykose. Rinshô. Hinfuhihyô, *4*, 281—285, 1939.

PACCHIONI G., Sul comportamento del criptococco farciminoso del Rivolta inoculato nel tessuto sottocongiuntivale tarsico del coniglio. Nuova veterinaria, *20*, (2), 6—11, 7 fig., 1941.

PAVAN G., Su due episodi di *Crenothrix kühniana* nel veronese. L'Igiene moderna, *34*, (1), 17—19, 5 fig., 1941.

PENNINGTON E. S., A study of the incidence of air-borne molds and of skin sensitivity to molds. South. Med. J., *33*, 931, 1940.

PENNINGTON E. S., A study of clinical sensitivity of air-borne molds. J. of Allergy, *12,* (4), 388—402, 1941. (*Alternaria, Mucor, Monilia, Hormodendrum, Cephalotecium, Aspergillus, Penicillium).*

PERAGALLO I., Sulla possibilità dell'impiego della membrana corion-allantoidea dell'uovo in sviluppo per lo studio dei miceti. Giorn. Batt. Immun., *27,* (10), 378—380, 1 fig., 1941.

PIESCHEK G., Erytema nodosum trichophyticum. Diss. Köln, 1939.

PIGORINI L., Contributo alla conoscenza del quadro radiologico polmonare da *Monilia pseudolondinensis.* Quaderni di Radiologia, *5,* nuova serie, (4), 323—332, 6 fig., 1940.

POIX G., Actinomicosi polmonare. La Presse Médicale, (17), 11. 5. 1943.

POMA A., Nota sulle micosi polmonari. Minerva medica, (33), 18, 8. 1943.

PONTECORVO G. a. GEMMEL A. R., Colonies of *Penicillium notatum* and other moulds as model for study of population genetics. Nature, *154,* 532, 1944.

PONTECORVO G., Genetic proof on Heterokaryosis in *Penicillium notatum.* Nature. *154,* 514, 1944.

PRATT H. W. a. ROORBACH C. L., Species specificity of *Alternaria* in Asthma and Hay fever. J. of Allergy, *12,* (5), 431—437, 4 figg. 1941.

REDAELLI P. e CIFERRI R., Le granulomatosi fungine dell'uono nelle zone tropicali e subtropicali. Vol. pp. 698, 190 figg. in nero e 5 figg. a colori, bibliografia e indici. Sansoni Ed., Firenze, 1942.

REDAELLI P. e CIFERRI R., Primi reperti di Caulobacteriales acquadulcicoli italiani. Mem. Istit. ital. Idrobiol. M. De Marchi, 1° Congr. Idrob. e Limnol., Milano, Aprile 1942, 107—114, 1 fig. 1942.

REDAELLI P. e CIFERRI R., Relazione sul primo quinquennio di attività (1938—1943) del Centro di Micologia Umana e Comparata (Univ. di Pavia). Atti Istit. Bot. Univ. di Pavia, serie 5°, *3,* (1), 1—90, '43.

REDAELLI P. e MARIANI P. L., Le Algheosi. Notizie generali sulle alghe parassite dell'uomo e degli animali, e studio sella loro biologia nei rapporti con gli ospiti. Medicina e Biologia, (Roma) *4,* 63—131, 24 figg., 1943.

ROLOFF W., Pseudoaktinomykose. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Infektion der Pneumolysenhöhle. Beitr. klin. Tuberk., *98,* (2), 100, 1942.

ROSSI G., Morbo di Simmonds da actinomicosi diencefalo-ipofisaria. La Clin. Pediatrica, *23,* 67 pp., 14 figg., 1941.

ROUFOGALIS S., Untersuchungen ueber die Besiedlung des Neugeborenendarmes mit dem *Bacterium bifidum.* Ztschr. Hyg., *123,* (2), 195, 1941.

ROUFOGALIS S., Untersuchungen ueber das Herkommen des *Bacterium bifidum* bei der werdenden Mutter. Arch. Gynäkol., *171,* (3), 459, 1941.

RUFFILLI D., Sulle capacità dell'*Aspergillus glaucus* di metabolizzare la paraminobenzen-solfonammide. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., *17,* (1), 34, 1942.

RUIZ ARCE, Moniliasis vulvovaginale. Anais brasil. de Ginecologia, *9,* 483—570, 1940.

SALADINO E., Sulle possibilità di preparare antigeni da miceti a mezzo della estrazione fenolica secondo Petragnani. La settimana medica, n. serie, *31,* (9), 327, 1943.

SALTNER L., Die tiefen Pilzerkrankungen der Haut in den Tropen. Dtsch. Mil. Arzt., (7), 423, 1941.

SANGIORGI G., La istoplasmosi murina o „malattia del Sangiorgi". Athena, *11,* (2), 33, 1942.

SATÔ, Vulvovaginitis blastomycetica mit Haut- und Blasenkomplikationen. Japan. J. of Dermat., *44,* 399—415 (japanisch), 410 (deutsch), 1938.

SCHEN A., Ueber Aktinomykose des Kopfes und des Halses. Diss. Freiburg, 1940.

SERRA G., Contributo allo studio delle micosi profonde circoscritte. Ann. Patol. Trop. e Parasit., *2,* (3), 129—152, 8 figg., 1941.

SERRANO M., Beiträge zur Systematik pathogener Sprosspilze. Zbl. f. Bakter., I Orig., *147,* (2), 98, 1941.

SERRANO M., Ueber Systematik von 18 aus verschiedenen Krankheitprozessen der menschlichen Haut gewonnenen Sprosspilzen. Z. Parasitenkunde, *12,* (1), 1, 1941.

SFORZA M., Pluralità di specie del cosidetto *Actinomyces farcinicus.* Arch. Ital. Sci. med. colon. e parassitol., *21,* (8), 406—418, 1940.

SFORZA M., Actinobacillosi in Eritrea (Studio sperimentale del germe e delle tossine). Arch. ital. Sci. med. colon. e parassitol., *22,* (3), 106—136, 1941.

SMITH L. M., Blastomykose und ähnliche Infektionen (inglese). J. Amer. med. assoc., *116,* (3), 1941.

SOLERO C., Contributo allo studio delle micosi del seno mascellare. Minerva Medica, (33), 18 Agosto 1943.

SOMOGYI I., Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Hefe. Med. Verlag. H. Huber, Bern, pp. 110, 1944.

SPINA G., Sulle particolari proprietà biochimiche-fermentative dimostrate dall'*Actinobacterium Israeli* coltivato in brodo-cervello alle Rosenow. Boll. Istit. Sierot. Milanese, *21,* (7—8), 300—304, 1942.

STARCOFF OLEG, Contributo allo studio della clamido-reazione di Puntoni. Comportamento dei corpi di Negri e dei grani di Rivolta di fronte al nuovo metodo di colorazione. Annali d'Igiene, *51,* (5), 330—333, 3 figg., 1941.

STAUB H., Ueber den Mechanismus der Chemiotherapeutica. Schw. med. Wschr., (19—20), 552—558, 1943 (Penicillina).

STILES W. W. a. CURTIS A. N., *Torula*-meningo endephalitis. J. Amer. Med. Assoc., *116,* (15), 1941.

SWARTZ J. H., Elements of medical mycology. Vol. pp. 179, Ed. Guine a. Stratton, New York, 1943.

TEDESCHI N., Contributo allo studio delle micosi cutanee in soggetto diabetico. Ann. Pat. Trop. e Parassit., *2,* (12), 705—714, 1941. *(Alternaria tenuis).*

TESAURO S., Considerazioni cliniche su di un caso non comune di microbide da *Trichophyton gypseum asteroides.* Gazz. Osped. e Clin., *60,* (32), 755—761, 1939.

THJÖTTA TH., *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing a fatal meningeal infection in a human being. Acta pathol. microb. scandinav., *20,* (3), 597—606, 1943.

THREN R., Kritische Versuche zum biologischen Pilztest *(Phycomyces*-Wachstamstest auf Vitamin B 1). Vit. u. Horm., *1,* (2), 100, 1941.

TICHOMIROI D. M. u. BOGDANOVIC S. B., Einige pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Veränderungen bei Ratten die mit *Ustilago maidis* vergiftet wurden. Frankf. Z. Pathol., *55,* (1),7, '41.

Tinozzi F. P., Rara infezione da ifomicete *(Penicillium lilacinum)* determinata da puntura di una zecca. Boll. Soc. Med.-chir. di Pavia, (1), 1942.

Tomppert H., Die durch Schimmelpilze *(Aspergillus, Mucor, Penicillium)* verursachten Erkrankungen unserer Haustiere. Diss. Hannover, 1941.

Turu H., Ueber die Perléche der Volksschüler, Hifu. Hinuyô, 6, 516—522, 1938 (giapponese).

Tzimerinoff A. A., Epidermofizia delle unghie da Epidermophyton Kauffman—Wolf. Vracebuse Dielo, (11—12), 799, 1940.

Urso B., Ricerche sul Tokelau sperimentale *(Endodermophyton indicum)*. Arch. ital. sci. med. colon. e parassitol., *23*, (1), 385, 1942.

Van Beyma Thoe Kingma F. H., Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. VII Mitt. Arch. van Leeuwenhoek, *8*, 1942. *(Arachniotus dankaliense* n. comb., *Penicillium ingelheimense* n. sp., *Phoma suecica* n. sp. *Margarinomyces decumbus* n. sp., *Phialophora atra* n. sp., *Phialophora cyclaminis* n. sp., *Tritirachium cinnamomeum* n. sp., *Tritirachium roseum* n. sp., *Cephalosporium lanoso-niveum* n. sp.)

Van Beyma Thoe Kingma F. H., Beschreibung der im Centraalbureau voor Schimmelcultures vorhandenen Arten der Gattung *Phialophora* Thaxter und *Margarinomyces* Saxa, nebst Schlüssel zu ihrer Bestimmung. Arch. v. Leeuwenhoek, *9*, 1943.

Vinciguerra S., Criptococcosi primitiva dell'apparato respiratorio. Med. trop. e subtrop., (8), 142, 1942.

Voegt H., Zur Klinik und Therapie der Aktinomykose. Dtsch. Z. klin. Med., *190*, (1), 57, 1942.

Walther F., Die Geschichte der Aktinomykose. Diss. Gottingen, 1941.

Wassmund M., Neuere Auffassung ueber Aktinomykose. Z. ärztl. Fortbild., (9), 197, 1942.

Weidman F., D. a. Rosenthal L. H., Chromoblastomycosis: a new and important Blastomycosis in North America. Arch. of Dermat., *43*, *(1)*, *62*, *1941*.

Wohlwill e Morais D., Histoplasmosis di Darling (primo caso osservato in Portogallo). Lisboa Medica, settembre 1943.

Wyssmann E., Ueber Aspergillosen beim Rind. Schweiz. Arch. Tierheilk. *83*, (5), 166, 1941.

Yō T., Vier Fälle von Intertrigo blastomycetica bei Erwachsenen. Bericht von der 1 Sitzung Jap. Dermat.-Urol. Tochtergesellschaft in Taihohu, vom 16.10.1939.; Jap. J. of Dermat., *46*, 179—180, 1939.

Zacho, Vier Fälle von Aktinomykose mit Sulphothiazon behandelt. Merd. Med. (Stockholm), 2757—2758, 1942 (in danese).

Zanetti G., Micetoma linfoghiandolare umano. Atti R. Accad. Sci. di Ferrara, 1941—1942.

Zecchini M., Sulla etiologia del farcino actinomicotico del bue. Ann. Pat. Trop. e Parassitol., *3*, (1), 15—26, 1942 *(Actinomyces farcinicus)*.

Zeldenrust J., Aktinomykose von Herz und Lungen. Nederl. Tijdschr. Geneesk., *22*, 11, 1941.

On the newer trend of classification of dermatophytes [1]

Tibor BENEDEK, M. D.

(Research Laboratory, Salvation Army Clinics Chicago, III.)

(20.2.1948)

The following discussion of the question of classification and nomenclature in medical mycology will not propose any new, artificial scheme to increase the great confusion already in existence, which is so detrimental to teaching as well as to national and international understanding of the literature.

SABOURAUD established, back in 1894, in *Les Trichophyties Humaines* the first workable classification and nomenclature in medical mycology. This classification underwent further development and final critical evolution in 1910 in his classical work *Les Teignes*.

As is well known, SABOURAUD's system created four form genera for the pathogenic fungi, zoophilic and anthropophilic, the dermatophytes:

(1) *Microsporum*
(2) *Trichophyton*
(3) *Achorion*
(4) *Epidermophyton.*

These genera and generic terms have proven admirably suitable for a basic understanding among dermatomycologists.

Fungus diseases of the integument, the scalp included, are a major field of dermatologic endeavor. Dermatologic diagnosis is based on the knowledge of the primary lesion. Thus, for the dermatologist, there is quite naturally one all important question dealing with the common dermatomycoses: what is the relationship between host and parasite, in other words, what is the relationship of the fungi to the hair and to the skin.

SABOURAUD, as a pupil of PASTEUR was not only a mycologist, but, also being a pupil of BESNIER he also was an eminent dermatologist. Therefore, it is quite natural that in the complex system of classification of Sabouraud the developmental history of the primary lesion, and the host-parasite relationship plays a central and a decisive role. The dermatologist, therefore, confronted with a mycotic lesion of the scalp or of the glabrous skin, will ask the basic questions, and look for the signs, whether the hair has a spore sheath; whether it is invaded by fungus elements; or whether the hair is encased only externally by mycelial and spore elements; whether the fungus reveals typical scutula formation, or whether

---

[1] Read in the session of the Mycological Society of America, December 29, 1947, at the Chicago meeting of the American Association for the Advancement of Science.

it never invades the hair and causes pathologic changes only in the superficial layer of the skin.

For the dermatologist this type of thinking is a basic law, this is the only natural way he can correlate clinical facts with mycological findings and mycological terms. For the dermatologist classification and nomenclature are not a self-centered endeavor, are not the final goal of his study. They are only and exclusively a means for understanding necessary to correlate primary clinical facts with mycological findings in the primary lesion. The dermatologist has mostly no botanical background. But the simple generic terms of Sabouraud's system: *Microsporum, Trichophyton, Achorion, Epidermophyton,* will awaken in his mind, simply by way of etimology, definite and well defined pictures about host-parasite relationship.

Furthermore, in the more difficult diagnosis of a mycosis of the scalp, a physical means, the indispensable Woodlight, helps him, by means of beautiful fluorescent colors: emerald-green for *Microsporum,* bluish for *Trichophyton* and canary-yellow for *Achorion,* to identify three of the four Form genera of Sabouraud.

You will fully understand — on the purely botanical side — that the dermatologist's understanding grows with and fails without Sabouraud's system of dermatophytes.

The botanical mycologist, quite naturally, by his sheer training, will approach the same problems from an entirely different angle. His basic and final aim is to make from the imperfect fungi in which class all the dermatophytes belong, perfect ones, to find the sexual forms of fructification which will enable him to put an imperfect fungus on the right place in the natural system based on sexual reproduction. The mycologist, on the botanical side, will have little interest, and I might say little understanding for the importance of the primary skin lesion, since he has no dermatologic background.

In my opinion, these are the two basic facts in any discussion dealing with the problem of classification and nomenclature of the dermatophytes.

From 1894 until the close of the second decade of the present century medical mycology trived and grew, and a sound general knowledge spread all over the world. The SABOURAUD system of dermatophytes, despite certain shortcomings from the standpoint of the cryptogamic botanist, has proved itself, already for over half century, as an indispensable and most handy tool in the teaching of medical mycology.

DODGE, in his monumental work on Medical Mycology (1935) critically reviewed all the attemps to revise an old, accepted, practical system, such as SABOURAUD's classification is. With weighty arguments he refuted both the necessity and the practicability of introducing new classifications, fantastic in their terminology and having complete disregard of the International Rules of nomenclature. Furthermore, all these attemps did not serve to clarify any unsolved problems or to make easier the teaching and understanding of medical mycology. They revealed a strange unfamiliarity regarding what the purpose and aims of any classification should be.

To DODGE's outstanding critical review of these attemps, even a decade later, one cannot add anything. I fully join him in his criticism.

I simply want to recall to your memory the attemps of classification of CASTELLANI and CHALMERS (1919), OTA & LANGERON (1923), VUILLEMIN (1925), GRIGORAKIS (1925), NANNIZZI (1926), GUIART & GRIGORAKIS (1928), CIFERRI (1928), LANGERON & MILOCHEWITCH (1930).

Chronologically the last attempt to simplify and „improve" SABOURAUD's system came from the outstanding American mycologist, EMMONS, in 1934.

He found the present classification (1934) of the dermatophytes unsatisfactory. He considered the recent attempts to substitute a botanical for the clinical classification unsuccessful because of the failure to recognize proper criteria for a natural grouping. According to EMMONS the form of the conidium indicates a close relationship between the different species and genera of the ringworm fungi. He referred, in particular, to the macroconidia which were to differentiate by their morphology the *Trichophyton, Microsporum,* and *Epidermophyton* as genera.

He wanted to retain the generic names *Trichophyton,* and *Microsporum* — by right of priority, and *Epidermophyton* (in the sense of SABOURAUD) — because of established usage. He found the genus *Achorion* unnecessary, and he advocated the rejection of this generic name and distributed its species among the „accepted" genera, because „they are fertile sources of confusion".

EMMONS assumed that the dermophytes can be classified mycologically. He assumed, that such a natural classification would follow in a general way SABOURAUD's clinical classification. He meant that the inconsistencies of that classification could be avoided by shifting the emphasis from the clinical to the mycological aspect. EMMONS' newer classification reduced SABOURAUD's four basic genera to three by omitting the genus *Achorion* in the belief that it follows lines of relationship and will therefore, bring stability to the classification and nomenclature of the dermatophytes.

I cannot accept the reasoning of EMMONS either as to principles or practical grounds.

On principles, he is inconsistent in omitting the form genus *Achorion* and retaining, for instance, the genus *Epidermophyton* because of „established usage". When for over one hundred years there ever was an established usage this is that of the generic term *Achorion.* I also believe that there is no firm ground in the Rules of International Nomenclature which would permit the omission of one of the oldest generic terms in medical mycology.

Practically speaking, one cannot teach medical mycology on any level, undergraduate or postgraduate, omitting the genus *Achorion,* because one cannot dissociate the most important clinical feature of this form genus, the scutulum formation which is common to all species of this genus.

I consider any attempt made after SABOURAUD to „improve" his system or to introduce a „natural classification" as EMMONS meant it, to be doomed to failure.

A classification will become truly „natural", if and when we succeed to find or elicit the *perfect forms* of the dermatophytes. How such a system will look, is a mere guess at the present time. I want to mention only one example to clarify this point.

NANNIZZI, for instance, succeeded to elicit the perfect form in *Achorion gypseum.* This would put this dermatophyte into the Ascomycetaceae genus *Gymnoascus.* Some authors, however, will consider, though wrongly, this fungus as a *Microsporum.* Have we any indication in which order, in which familiy the *Microsporum* will belong when eventually the perfect form is found? The only indication in this respect is my own experiment

with *Microsporum Audouini*. By means of using the *B. Weidmaniensis* (1) on rice medium according to CONANT, I happened to elicit perithecium formation in this species. [1]) This perithecium, however, is incomparably more complex than the ascus formation which NANNIZZI happened to elicit in *Achorion gypseum*. These attempts indicate that the knowledge of the perfect forms will separate *Achorion gypseum* from *Microsporum Audouini*. They also underscore the complete futility to push around the imperfect forms of the dermatophytes from one well established classification like that of SABOURAUD into any other euphemistically but erroneously called „natural" system.

When further investigations will confirm these findings *Microsporum Audouini* and *Achorion gypseum* will definitely have different places in a truly natural system. Grouping or shifting the groups of imperfect fungi from one form genus to another does not make them perfect or more naturally placed in any sense of the word. Even then when we eventually would succeed to know the perfect forms of all the dermatophytes, SABOURAUD's system must survive in the interest of the common understanding of clinical mycologists. EMMONS' attempt for an innovation (the horrible term *Trichophyton Schoenleini)*, the last in the series for the time being, did not contribute to the improvement of the classification and did not bring any stability to the nomenclature of the dermatophytes.

From the standpoint of the dermato-mycologists the classification of SABOURAUD is basically important only on the generic level. The species within the four form genera: *Microsporum, Trichophyton, Achorion, Epidermophyton* certainly can be reduced in number, because in the first three form genera there are definitely many so-called species which are nothing more than dissociates or mutants. EMMONS proved this fact for the genus *Achorion,* I have shown it for the genus *Microsporum.* (2)

For the purpose of teaching and common understanding I consider it imperative to adhere firmly to the genera proposed by SABOURAUD which have been in usage more than half a century more or less all over the world.

It is clear in my mind that we will have two parallel systems of classification in dermatophytes, when and if we will succeed to know the perfect forms of all the dermatophytes. I do not see any possibility for a complete unification. The dermatologist, in general, is without botanical background, the mycologist is lacking dermatologic training. The final aims of both are divergent and they cannot be made congruent.

Thus, it is to be regretted that in the „Manual of Clinical Mycology" of CONANT and his associates, CALLAWAY accepted the classification of the dermatophytes suggested by EMMONS. In my long experience in teaching medical mycology I never succeeded in putting over the idea in the mind of my postgraduate students that Achorion Schoenleini should be, for any purpose, a *Trichophyton.*

On the American scene, JACOBSON (1932), and LEWIS and HOPPER (1943) completely follow SABOURAUD's system, although the latter are somewhat inclined to omit the form genus Achorion. Nonetheless, LEWIS & HOPPER, in reverence to and with respect for long historical usage, retained the term *achorion.*

The international understanding in medical mycology leaves much to

---

[1]) Yet unpublished data.

be desired. From nation to nation, from the area of one language to the area of another, the classification of the dermatophytes changes to such an extent that only the most initiated could follow up the developments in classification of dermatophytes that have taken place during the last decades, or can wade through the Babel of fantastic mycological terms.

SABOURAUD fought a successful fight in the controversy with GUIART & GRIGORAKIS, OTA & LANGERON, LANGERON & MILOCHEWITCH to sustain the integrity of his classification. Nonetheless, an authoritative work, BRUMPT's *Parasitology* (1927) adopted the classification of OTA & LANGERON (1923). Thus, the French have at least two concurrent classifications.

In Italy NANNIZZI's classification prevails. (3)

In South America the authorative work of DE ALMEIDA (1939) (4) introduced the classification of LANGERON & MILOCHEWITCH.

In Central Europe, BRUHNS & ALEXANDER (Germany, the area of the German language), and BALLAGI (Hungary) follow the original classification of SABOURAUD and in these countries no attempts have been made to increase the confusion.

In view of these facts the existing situation imperatively urges an international solution of these problem. Since there is hardly any possibility for a truly international congress of mycologists for many years to come, the authority of the Mycological Society of America is great enough to work out the most convenient classification which could be presented an international convention to pass upon. Our association could follow the lead of two great American scientific groups, the Bacteriologists and the Anatomists, which decisively influenced classification and nomenclature of their respective sciences on the international level. The time is ripe for action.

In conclusion, I would like to make the following suggestions as the basic formulation of my discussion:

(1) for the classification of dermatophytes SABOURAUD's four form genera: *Microsporum, Trichophyton, Achorion,* and *Epidermophyton* should be retained on the generic level. The number of species can be reduced by omitting dissociative forms as true species as soon as they are recognized as such;

(2) the manifold attempts to „improve" SABOURAUD's system are futile because they cannot make perfect fungi from imperfect ones simply by introducing incomprehensible terms, or by shifting them from a historically accepted and by usage approved group into another.

(3) future confusion and vain attempts in this field can be easily avoided by recognizing the simple fact that the aims of dermatologists and botanists are divergent. They cannot be brought to a common denominator. For the dermatologist the primary relationship between host and parasite is basic for his understanding. The botanist's dream is to find the perfect sexual forms of fructification for the imperfect forms of the dermatophytes, in order to put them in their proper place in a truly natural system.

(4) finally the suggestion is made that the Mycological Society of America should raise its decisive voice for the early solution of pending problems in classification, and to prevent further confusion.

Bibliography

For titles quoted up to 1935 see DODGE, C. W. Medical Mycology, The C. V. Mosby Co, St. Louis, 1935.

1. BENEDEK, T.: Unilateral stimulation of Microsporum Audouini by a new species of Bacillus. Mycologia, 35 (2): 222—252, 1943.
2. BENEDEK, T.: On a new species of the genus Microsporum, Microsporum Stilliansi, Benedek, 1937, n. sp. with special consideration of the phenomenon of dissociation in Fungi Imperfecti. — J. Trop. Med. April 1, 1938.
3. NANNIZZI, A.: Miceti dell'Uomo e degli Animali. Siena, S. A. Poligrafica Meini, 1934.
4. DE ALMEIDA, F. P.: Mycologia Medica. Companhia Melhoramontes de Sao Paulo, 1939.

Biological significance of the pseudomycelium in asporogenous yeasts

I. Reciprocical inhibition of parallel colonies

by

G. MAGNI.

Centro di Micologia umana e comparata, Milano-Pavia

(with 2 plates)

(11. 10. 1947)

The problem of mycelium formation by asporogenous yeasts has a particular importance in view of the bases of classification of these organisms.

By pseudomycelium will be meant here the true pseudomycelium not these short chains of elongated cells that can be seen in some cultural conditions, and wich may also be seen as a consequence of dissociative phenomena in cultures of non-mycelium yeasts. The mycelium producing yeasts in suitable cultural conditions make a macroscopically clearly visible mycelium of variable, but always conspicuous dimensions.

The importance of this character in classification was stressed by CIFERRI and REDAELLI (1929), who distinguished within the family *Torulopsidaceae* the subfamilies *Mycotoruleae* and *Torulopsideae* (that were later named more exactly by LODDER (1934) *Mycotoruloideae* and *Torulopsidoideae)*. The first mentioned of which is mycelium-producing, while the latter is not.

The conclusions reached by these authors were criticized by LANGERON and TALICE (1932), who claimed the necessity of a revision of this classification, supporting the view that the character of mycelium-production cannot be considered as sufficiently constant, „c'est un phénomène capricieux qui dépend d'une foule de facteurs et principalement du milieu de culture....." and its presence or absence could not be taken as a key-character for the classification into subfamilies.

It seems to us that all of these uncertainties and contradictions arise essentially from the nearly total lack of precise knowledge about the biological significance of mycelium-production, and a lack of quantitative data on the conditions determining its production. Indeed, it is clearly impossible to find in the great bulk of observations recorded up to now. a single instance of a surely acquired fact that is not in open contradiction to the data of some other authors. We do not believe it necessary to mention here all the results obtained by previous authors, since these results have been accurately collected and criticized by TALICE (1930). It is seemed sufficient to state the opinion that none of the factors considered up till now clearly inhibits or enhances the mycelium-production, except perhaps one, that has not been studied up to now in sufficient detail,

namely the nutritional level of the culture media, including both the initial concentration of nutrients and nutrilites in the medium and the exhaustion of nutrients and nutrilites taking place during vegetative growth of the plastosporous form of the yeast.

In this light it therefore seemed that it would be worth while to start a series of quantitative investigations in order to clarify the problem and to reach clear conclusions concerning the biological significance of the pseudomycelium.

The first part of this work will deal with results concerning a single point of the subject, namely the conclusions of LANGERON and GUERRA (1939) concerning reciprocical influences on mycelium-production arising between parallel colonies, and the possible existence of a principle inhibiting the mycelium-production.

The authors mentioned have studied accurately the mycelium-production in linear colonies grown in parallel fashion in different cultural conditions, and came to the conclusion that these cultures when grown, at a suitable distance, do not produce mycelia on the sides between the parallel colonies, while mycelium production is normal on the free side. They thus come to the conclusion, „que l'influence impêchante ne se trasmet pas par l'air; qu'elle se trasmet à travers le milieu de culture. Il ne s'agit donc d'une radiation (mitogénétique ou autre) comme on aurait pu être tanté de penser". Though not denying the possible influence of medium impoverishment, they favor the hypothesis of the production of an inhibitory substance diffusing into the medium, „Mais la diffusion est arrêtée net par le barrage de la strie, même avec des stries de longueur inégale: du côté externe la filamentisation est toujours normale. Il est possible qu'il s'agisse d'un phénomène d'électrophorèse résultant d'une différence de potentiel suffisante pour arrêter la diffusion au niveau de la strie formée d'une accumulation de cellules vivantes".

Unfortunately the lack of photographic documentation does not allow a direct estimate of the results obtained by the two authors, especially an estimate of the quantity of mycelium grown in the different experimental conditions; in any event it seems that the existence of an inhibitory principle does not necessarily follow from their results, which might also be explained by the simple hypothesis of the exhaustion of nutrients in the culture medium; such an explanation follows from the experiment that will be here recorded.

A strain of CANDIDA non-fermenting was employed that constantly showed a very luxuriant mycelium production on LANGERON carrot and potato medium. This medium has the following composition :

carrot pulp	20 g.
potato pulp	20 g.
water	1000 ml.

It is extremely poor in nutrients.

On a Petri plate containing Langeron medium with 2 % agar, zones of 2 cm. breadth and the length of the plate were marked. On either side of these zones linear colonies of the yeast were sown, at variable distances apart. At certain distances, on the side between colonies no mycelium production was seen, while the production was very abundant on the external side. The distance that was necessary in order to observe the

phenomenon varied between 8 and 15 mm. according to the thickness of the agar. Increasing the distance between the two parallel colonies, caused the mycelium production to appear also on the internal sides becoming always more abundant as the distances increased, until for considerable distances it became practically equal to the mycelium production on the external sides. These data confirm the experiments by LANGERON and GUERRA (though it should be noted that a different strain of *Candida* was employed), but the successive results do not give support their hypothesis.

Three series of experiments were made:

1) In the same plate two to four agar zones of apparently equal thickness were marked. Two zones were cut longitudinally at their centers, and a small strip of agar removed; after this the linear cultures were sown in such a way that in the discontinuous zones the distance between the colony and the edge of the zone was D/2, where D is the distance between two parallel colonies on continous agar zones. By choosing distances suitably, according to the thickness of the agar, no colonies develop mycelia on the internal sides. Fig. 1 and 2 clearly show these results. The possibility of diffusion of an unknown inhibitory substance through the culture medium was thus discarded while the hypothesis of an impoverishment of nutrients in the medium could still be maintained. In order to obtain more reliable data the following series of experiments were performed;

2) The preceeding experiments were repeated with greater distances between the colonies, in order to allow a partial development of the mycelium. The dimensions of mycelia region were measured (with the aid of a dissection microscope 16 x) by means of a outside-inside calipers equipped with a Verner graduated at 0,05 mm. Experiments were made at eight different distances (5—6—7—8—9—10—11—12—) from the edge of the agar zone and with respectively 10—12—14—16—18—20—22—24 mm. between the colonies on the continuous agar zone. The variability of the breadth of the mycelia on the internal side was very great, as a consequence of the variability of the thickness of agar from plate to plate, and therefore account was taken, in the statistical treatment of the data, of the difference between the width of mycelia region of a single colony and that of the parallel colonies in all pairs of measurements. For each of the eight distances twenty pairs of observations were made. The statistical significance of the mean differences was tested by means of „Student's" *t*-test. In table n.l. are collected the values obtained for *t* at each distance with their respective degrees of freedom and probabilities.

Table No. 1

Value of D/2	Student's t-value	Degrees of freedom	P
mm 5	0,55	19	0,60—0,50
mm 6	0,81	19	0,50—0,40
mm 7	1,01	19	0,40—0,30
mm 8	0,74	19	0,50—0,40
mm 9	1,83	19	0,10—0,05
mm 10	0,96	19	0,40—0,30
mm 11	1,52	19	0,20—0,10
mm 12	1,34	19	0,20—0,10

It is apparent from the table that none of the eight values of *t* cal-

culated from the experimental results exceeds the value corresponding to $P = 0,05$, i.e. $t = 2,09$ for 19 degrees of freedom. Therefore, none of the eight mean differences is significantly different from zero, thus excluding the possibility that any inhibitory substance diffuses in the culture medium.

It remained lastly to prove that, in the absence of the inhibitory substance, the true cause of the lack or partial lack of development of mycelium on the internal side of the parallel colonies results from the impoverishment of the culture medium with respect to nutrients.

3) Series of three zones with parallel colonies were preparared in such a way that there was no development of mycelium in the internal side; after four days from the inoculation the plate was photographed. Then on the first zone a drop of the LANGERON liquid medium was deposited between the two colonies, while a drop of distilled water was similarly deposited on third zone, while the second zone was left untreated. After further incubation of three days the plate was examined again. The results have always been so clear that no statistical elaboration was necessary; the mycelium, at first absent in all zones, did not developed in the control zone nor in the zone to which distilled water had been added between the parallel linear colonies, while it developed abundantly in the colonies between which a drop of nutrient medium had been depossited. Fig. 5—6—7—8 illustrate these experiments.

Explanation of the figures

The following conclusions may be drawn from these experiments:

1) It has been demonstrated that no substance inhibitory to the development of mycelium is produced by the vital activity of a yeast colony. The lack or partial lack of development of mycelium must be attributed to the impoverishment of nutrients in the culture medium.

2) In light of the experiments recorded the mechanism of action of mycelia in asporogenous yeasts may be reconstructed as follows. If the cultural medium is sufficiently poor as to become rapidly exhausted after the initial growth of a colony of blastosporous cells, there subsequently appears a mycelium when the concentration of nutrients has fallen to a rather constant low level (judged by the normally uniform time of appearance of mycelia). This hypothesis confirms the HENRICI'S words (1930), „In general..... the form of the organism is more or less an expression of the rate of growth. Where conditions are favorable for rapid multiplication, as with early assimilable or fermentable CH_2O and abundant aeration, the yest-form predominates. When conditions are not so favorable mycelium is formed". The mycelium presents clear advantages over the blastosporous cells.

1) The elongated form gives to the pseudycelial and mycelial cells a greater surface for a given volume (that is, they have a higher S/V ratio) and thus probably allows a better exploitation of the scarce resources of nutrient (if absorption per unit-area is constant for both yeast and mycelial forms.)

2) They have greater possibilities for a rapid progression towards new sources of nutrient or better towards zones where the concentration is greater. That this may be the actual nature of mycelium action in asporogenous yeasts and further that a sort of chemiotropism towards zones

richer in nutrients possibly exist, cannot be considered as demonstrated. It is hoped to study these problems in the near future.

3) As concerns the phenomenon of inhibition of mycelia our experiments, and the hypotheses to which they give rise, allow us state the following conclusions: if on a side of a growing yeast colony, a zone of cultural medium exists containing a quantity of nutrients sufficient to allow the formation of mycelia, this will be produced, but if the surrounding zone of cultural medium is so small or poor that all its resources of nutrients have been exhausted by the first growth of blastosporous cells, the mycelium will not be produced. The addition of a small quantity of nutrient material which by diffusion into the agar, may cause a rise of the concentration of nutrients in the medium, will however be sufficient to allow the development of a mycelium.

4) The hypothesis, that an increase in cell surface due to the formation of mycelial cells may result especially in a greater efficiency of absorption of nutrients (and not merely of water) is shown by the non-modifiability, within certain limits, of mycelium production by the moisture content of the medium. Morever, in the last group of experiments it was seen that the addition of distilled water between colonies lacking mycelia on their internal edges did not modify the course of the experiment.

Summary

By means of a quantitative investigation of mycelium formation in an asporogenous yeast the author reached the conclusion that pseudomycelium-production facilitates the absorption of nutrients when these are highly diluted in the culture medium. The reciprocical inhibition of mycelia by parallel growing colonies does not depend upon an inhibitory substance diffusing into the medium, but on the exhaustion of the culture medium.

Résumé

L'auteur ayant analizé par rechèrches quantitatives le phénomène de la filamentisation dans un champignon levuriforme conclue que la filamentisation a le but de faciliter l'absorption des matérieux nutritifs lorsque ces-ci sont bien dilués dans le milieu de culture. L'inibition réciproque entre le pseudomycelia des colonies de levure parallèles n'est pas déterminé par une substance empéchante qui se trasmet dans le milieu de culture, mais seulement par un empauvrissement des matérieux nutritifs.

Riassunto

I'A., avendo analizzato con esperienze quantitative, il fenomeno della filamentizzazione in un lievito asporigeno conclude che la comparsa del filamento ha lo scopo di facilitare l'assorbimento dei materiali nutritivi quando questi sono troppo scarsi nel mezzo di cultura. L'inibizione reciproca dei filamenti di colonie di lievito parallele non è dovuta ad una sostanza inibitrice diffusa nel mezzo di cultura ma semplicemente ad un impoverimento del mezzo culturale stesso.

Bibliographie

CIFERRI, R. and REDAELLI, P. Annales Mycologici **27**: 243—295, 1929 pag. 16. — HENRICI, A. T. Molds, Yeasts and Actinomycetes J. Wiley New-York 1930. — LANGEROW, M. et GUERRA, P. Ann. Parassitol. **17**: 580—589, 1939. — LANGERON, M. et TALICE, R. V. Ann. Parassitol. **10**: 1—80, 1932. — TALICE, R. V. Ann. Parassitol. **8**: 394—410, 1930.

Explanation of figures

Fig. 1, 2 (above) Parallel colonies at distance = D; no growth of mycelium on the internal side.
(under) Colonies at distance = D/2 from the edge of the agar zone; no growth of mycelium on the internal side.

Fig. 3, 4 (above) Parallel colonies at distance = D, with partial growth of mycelium on the internal sides.
(under) Colonies at distance = D/2 from the edge of the agar zone with a quantity of growth of mycelium, similar to that above, on the internal side.

Fig. 5 Parallel colonies with no growth of mycelium on the internal sides.

Fig. 6 The same plate in fig. 5 (3 days later). In the superior zone Langeron liquid medium was added between the colonies; in the inferior zone distilled water has been added between the colonies; in the central zone no addition was made.

Fig. 7 Parallel colonies with no growth of mycelium on the internal sides.

Fig. 8 The same plate in fig. 7 (3 day later). In the superior zone Langeron liquid medium was added between the colonies; in the inferior zone distilled water has been added between the colonies; in the central zone no addition was made.

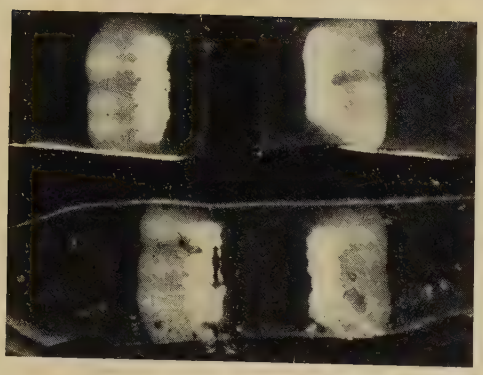


Fig. 1

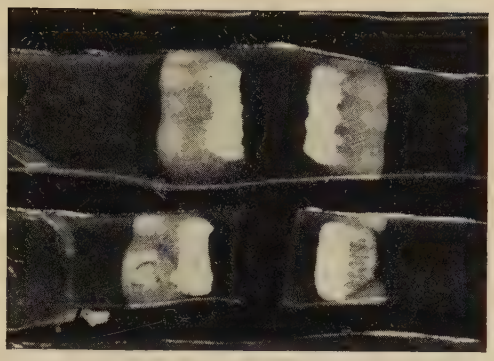


Fig. 2

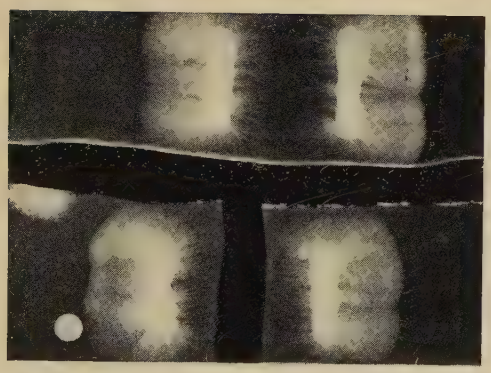


Fig. 3

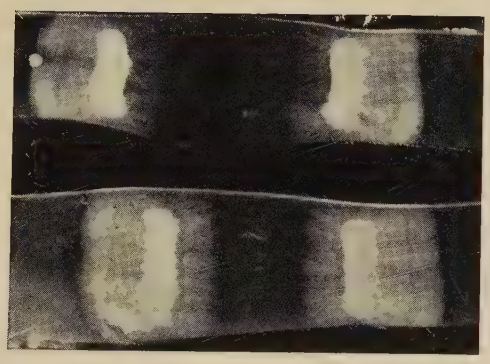


Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Antibiotic substances and control of gram-negative microorganisms: Activity of Penicillium chloroleucon

by

Giovanni MAGNI and Anna VILLA

(from the Centro di Micologia umana e comparata di Milano — Pavia)

(11. 10. 1947)

Since the early classic researches on Penicillin, a fact stood forth, which at first seemed to put a strong limitation to the activity of the new drug: it was its almost exclusive activity upon the gram-positive microorganisms. Afterwards, due to the higher purification and progressive concentration of the active substance, such a specificity appeared to be less absolute, but it remains as yet uncertain and very restricted the possible use of penicillin in the chemiotherapy of the diseases by gram-negative microorganisms, though „in vitro" may be observed a certain degree of antibiotic activity even upon the latter microorganisms.

As yet the various types of penicillin demonstrated a very little, if any, activity against that large gram-negative group to which belong the intestinal (enterotropic) microorganisms, with all the important *Salmonellae,* the *dysenteric* ones, *V. cholerae* and *B. coli.*

A mere glance at the bacteriostatic spectrum of penicillin (ABRAHAM and coll. 1941), discloses that the strongest activity takes place against *S.Gartneri,* its complete inhibition appearing at a 1/20,000 dilution, compared with an activity of 1/2,000,000 against *Staphylococcus.* The other gram-negative strains are affected between 1/10,000 and 1/1,000. It seems, therefore, quite correct the inquiry, by students, for the antibiotic activity of microorganisms, whatever they may be — moulds, yeasts, schizomycetes — in order to solve also the problem (not a light one) of the control of gram-negative infectious diseases.

Apart from *E. coli,* upon which some brilliant results have already been obtained (see streptomycin and subtilin), the available literature is rather scarce and moreover somewhat disagreeing. Before the discovery of penicillin as well as in more recent years, have appeared a number of references concerning the activity of antibiotic substances against the gramnegative germs; they lacked, however, of quantitative data, what can suggest, it seems, that the students were dealing with very limited activities, worthless of a more careful study.

Reviewing only the activity against gram-negative germs of the antibiotic substances produced by Hyphomycetes, one may list: a small activity of proactinomycin, as far as a 1/60,000 dilution, against *V. cholerae;* against *S. typhi, S. paratyphi* and *B. coli* as far as 1/20,000; the same substance, however, acts upon pneumococcus at 1/1,500,000 (GARD-

NER and CHAIN 1942). Fairly active against some *Salmonellae* (*S. Schottmülleri,* and *S. Breslau)* have been demonstrated by WAKSMAN and coll. (1943) both fumigacin and clavicin, whilst ATKINSON reported (1942) a certain degree of activity by penicillin upon *E. typhosa.* In 1940 WAKSMAN observed that streptomycin acted upon *Shigella gallinarum;* in addition other AA. reported various not well delimited activities upon gram-negative germs on account of actinomycetin, aspergillic acid, penicillic acid and streptothricin (WAKSMAN 1945).

Personal researches

The AA. studied the antibiotic activity against gram-negative germs of moulds isolated from the soil through the following method: g. 2—3 of ordinary garden soil are suspended in saline and diluted 1: 100 times; a few drops of the latter suspension are poured on an agar-carrot plate. On the surface appear, usually, small mould colonies in number ranging from 30 to 100; as a rule we used, for the isolation of antagonists, only the plates bearing the smaller numbers of colonies. Before the growth becomes confluent, takes place the isolation, by a transfer on other agar-carrot plates. Sometimes all the colonies of a plate belong to the same type; from these of course a unique sample is transferred.

By this method have been isolated from various garden soils in Milan and surroundings 100 moulds, mostly Penicilli. Immediately after isolation, the moulds have been tested for their antibiotic properties by means of the following method: a loopful of spores is suspended in saline, and 0,5 ml. of the suspension are poured and thoroughly mixed by a glass rod on an agar-carrot plate afterwards incubated at 25° C. for 7 days. At the seventh day plugs of agar of cm^2. 1 in surface, covered with the mould's mycelium, are removed from the culture, and placed on the surface of an agar plate seeded with the tested germ. After 24 hours, in presence of antibiotic property, can be observed clear sterile zones surrounding the transferred plugs, fully resembling the ones obtained by the original method of measuring penicillin, by the cylinders sinking into the agar.

To obtain always reliable data we researched the most favourable conditions for the aforesaid method; without describing thoroughly all the performed experiments, we report here the conclusion reached by us: among the different media tested, in view of the production of antibiotic substance, the best one appeared the agar-carrot at a pH between 6,5—6,6 in layers of 4—5 mm. The presence either of glucose or another sugar does not interfere notably into the production rate of the substance; the best time for a fair yield ranges, according to the strain, form. 5 to 9 days. It must be said, however, that in this cultural medium the antibiotic substance does not suffer by an excess of incubation, while the contrary is true for the liquid media.

The following bacterial strains were adopted:

Staphylococcus aureus Oxford
E. coli 90
S. typhi 45
V. cholerae 138
Dis. Shiga Torino
all of which kindly supplied by I.S.M.S.B.

The results obtained from these first tests can be summarized as follows:

against	*Staphylococcus*	inactive	75	moulds	active	25 moulds
„	*E. coli*	„	100	„	„	0 „
„	*S. Typhi*	„	100	„	„	0 „
„	*V. cholerae*	„	97	„	„	3 „
„	*Dis. Shiga*	„	98	„	„	2 „

No consideration has been given the moulds active against staphylococcus, so that the moulds investigated have been:

no. 50 active against *V. cholerae*
„ 76 „ „ „ „
„ 86 „ „ *Dis. Shiga*
„ 96 „ „ „ „ and *V. cholerae*

But before proceeding to the classification of these four moulds, we thought it correct to confirm their action, observed on solid media only, by the usual ABRAHAM and coll.'s method for penicillin, testing the production of the antibiotic substance against a larger spectrum of gram-negative germs.

Notwithstanding the repeated transfers into liquid media we obtained no clear activity on account of moulds Nos. 76, 86, 96; the mould No. 50, on the contrary, always demonstrated a fair degree of antibiotic action. This strain therefore has been given a careful attention, to get a sounder analysis of its activity.

Antibiotic activity of P e n i c i l l u m c h l o r o l e u c o n Biourge

The mould 50 is a green *Penicillum,* identified at the Centraalbureau voor Schimmelcultures of Baarn (1) as a strain of *Penicillum chloroleucon* Biourge. One is here dealing with a white-myceliated, green-spored *Penicillum,* very easily giving spores on the carrot media.

At first the P. 50 has been cultured, for the yield of its active substance, in the ABRAHAM's medium. After the seeding of spores, either from a solid or a liquid culture, may be detected a fast growth of white mycelium, which fully sporulates within 3—4 days; sometimes, however, the sporulation does not appear even after 15—20 days of incubation; in this case the mycelium becomes very thick, the layer reaching about ½ cm. of height. The factors affecting such a behaviour are very difficult to detect, since the dissociation into the spore-bearing and non-sporiferous cultures has often taken place under the same experimental conditions. The seeding with mycelium, on the contrary, gives a much smaller growth and sometimes an incomplete mycelial felt.

Since its first transfers into ABRAHAM's medium, P. 50 demonstrated a good antibiotic activity, reaching its best after four passages in the same medium; its spectrum against the gram-negative germs, compared with its action upon Staphylococcus, is given by the following table.

---

1) We thank here Doct. WESTERDIJK of her kind collaboration in the classification of our **P. ch. B.**

Table 1

Bacteriostatic spectrum of Pen. chl. against gramnegative microorganisms

	partial inhibition	complete inhibition
(Staphylococcus)	1 : 150	1 : 100)
V. cholerae	1 : 120	1 : 90
S. typhi	1 : 20	1 : 10
S. paratyphi A	1 : 50	1 : 10
S. paratyphi B	———	———
Dis. Shiga	1 : 40	1 : 20
Dis. Hiss	1 : 10	———
Dis. Strong	———	———
B. coli	———	———

The seeding of mycelium in ABRAHAM's medium gives nearly no yield of antibiotic principle; it is instead good by seeding the spores, reaching its top during the growth of the asporogenous felt. Since, however, the production of such a felt is not always the same, the following data have been obtained in presence of sporiferous felts. The greatest yield has been obtained in the spore-bearing cultures after 12 days, in the non-sporiferous ones after 13—14. During the growth of P. 50, the pH of the cultural medium, originally between 6 and 6,2, declines till 4 and even less, but afterwards increases again; the best yield takes place when the reaction has either reached or a little surmounted (6—6,3) its initial value.

After this, we have tested some different media, in view of increasing the yield, but the results did not meet our hopes. We used the ABRAHAM's medium added with 2,5 % carrot-extract (to make easier the sporulation), 2 % yeast-extract, and 2 % peptone. The greatest yields given by these media did not differ notably from the ones obtained by the plain medium, as it is shown in table 2.

Table 2

Yields of antibiotic substance at the days:

Plain Abraham	1 : 20	1 : 20	1 : 40	1 : 40	1 : 50	1 : 80	1 : 80
Carrot-Ab.	1 : 50	1 : 70	1 : 70	1 : 50	1 : 50	1 : 10	
Abr. plus yeast	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 80	1 : 70	1 : 70	1 : 80
Abr. peptone	1 : 70	1 : 80	1 : 90	1 : 90	1 : 70	——	——

The above data demonstrate that the addition of growthpromoting substances gives the principle a faster rate of production, reaching its highest value at the 7th—9th day instead of the ones of the plain ABRAHAM's medium, showing the largest yields about 6,5—7 for the carrot and yeast media, and about 8—8,5 for the peptone medium. In the latter experimental tests we used mostly the peptone-ABRAHAM because, apart from the maximum of yield, the production of antibiotic substance appeared with this medium much more regular than with the other ones.

To increase furthermore the yield of antibiotic by our *Penicillum*, we have also tested the method of serial transfers, which seems to have given RAPER and ALEXANDER (1945) and GAILEY and coll. (1946) some brillant results, for what concerns the activation of *Penicillum notatum chrisogenum*. This method has been followed by us for more than

six months. The data collected have been deceptive: the serial transfers not only allow no increase in yield, but carry out a progressive inactivation to the nearly complete disappearance of the ability to the production of antibiotic. We can therefore confirm the results reported by various AA. among whom FOSTER and coll. (1934) who detected in *Pen. notatum* a clear tendency to the decreasing of yield by the method of serial passages.

More favourable results have been instead obtained by the isolation of monocytogenetic cultures from an active strain. Our data resemble those of WHIFFEN and SAVAGE (1947) for *Pen. notatum*. There cannot be observed the progressive reduction of yield, since by an active strain can always be isolated monocytogenetic strains endowed with a fair activity; but we also think it impossible to increase notably the yield of antibiotic by this method, because all of the monocytogenetic isolated strains vary about a medium value which can never be greatly improved even by numerous and successive isolations.

Notwithstandig this technic, however, we cannot prevent the accident of the fluctuations appearing in the yield of our penicillum. These fluctuations, following rather long cycles (a few months) are frankly out of control and cannot be avoided even in the monocytogenetic pure strains; they made our researches very difficult and hindered almost completely the concentration of the antibiotic substance. We therefore intend to follow, in the future, the method of mutations by X-rays, in wiew of getting strains with larger and more regular yields.

Characters of the active substance produced by Pen. chloroleucon

We have tested, at first, the specific action of *Pen. chlor.* against *V. cholerae*. Have been studied 14 strains of V. cholerae of different origin, kindly supplied by the *Istituto superiore di sanità* (Rome); of these strains 9 showed the same sensitivity of the No. 138 commonly used by us, 2 a little less, and 3 remained unaffected by our crude extracts.

Interesting data were supplied by the analysis of the heat resistance of our active substance. At 100° C. it demonstrates no inactivation within the first 50'; afterwards it undergoes a progressive inactivation, which however becomes complete only after a wet-heating of 100° C. for more than 90'.

A greater resistance, in comparison with penicillin, to the action of acid and alkaline solutions has been also observed. Its complete inactivation takes place at pH 2 after 15—20', at pH 12 after about 30'.

The crude extract of *Pen. chloroleucon* is severely toxic to animals; 1 ml. injected into the peritoneal cavity kills surely a guinea pig. Such a toxicity did not allow us, still at present, to perform „in vivo" tests, which must be withheld awaiting for the purification of the active substance. We have however observed, though by tests not yet confirmed, that the injection of crude extract in the peritoneum of guinea pigs inoculated with *V. cholerae* gives results resembling the ones of PFEIFFER's test, with lysis of vibriones.

Conclusions

It seems to us that our researches support the idea of the large natural diffusion of hyphomycetic strains active against grampositive microorganisms (25 % of our limited statistics) and of the scarcity of the strains

acting upon gramnegative germs. As a matter of fact we found, upon 100 investigated strains, an unique mould surely active against the latter germs.

Although other AA. (JONHS, PHILPOT and POLLOCK, 1946) report different results the strain of *Penicillum chloroleucon* by us isolated appears surely active against some gramnegative germs, chiefly *V. cholerae*, while such an activity was never observed by the aforesaid AA., who studied particularly the Barn's strain of the same mould. But nothing can hinder the hypothesis that, dealing with a strain kept in a laboratory collection for long time, they worked with a strain whose activity against gramnegative germs could have been lost. The characters of our active substance do not differ very much from those of penicillin, except for an higher resistance to the neutralizing agents (persistance in cultures, heat-resistance, acid and alkali-resistance).

Summary

The Authors investigated 100 moulds occurring in nature for the production of antibiotic substances against gram-negative microorganisms. Four of the 100 investigated strains were found to be active. Of these one strains of Penicillum chloroleucon which is active against **V. cholerae, S. typhi, S. paratyphi A,** and **Dis. Shiga,** was analysed with special care.

Riassunto

Gli AA. hanno studiato 100 muffe isolate dalla natura per la produzione di principi antibiotici contro i germi gramnegative. Ne hanno trovate attive 4. E' stato studiato in modo particolare tra questa un ceppo di **Pen. chloroleucon** che si è dimostrato attivo su **V. cholerae, S. typhi, S. paratyphi A, Dis. Shiga.**

Bibliography

ABRAHAM E. P., CHAIN E., FLETCHER C. M., GARDER A. D., HEATLEY N. G., FLOREY H. W., Lancet, **2**, 177—188, 1941. — ATKINSON N., Australian J. Exp. Biol. and Med., **20**, 287, 1942. cit. Waksman 1945. — FOSTER J. W., WOODRUFF H. B., McDANIEL L. E., J. Bact., **46**, 421—433, 1943. — GAILEY F. B., STEFANIAK J. J., OLSON B. H., JOHSON M. J., J. Bact., **52**, 129—140, 1946. — GARDNER A. D., CHAIN E., Brit. J. Exp. Path., **23**, 123—127, 1942. — JONHS M. F., Flora H. PHILPOT, POLLOCK A. V., Nature, **158**, 446, 1946. — RAPER H. B., ALEXANDER D. F., J. Elisha Mitchell Sci. Soc., **61**, 74—113, 1945, cit. Whiffen 1947. — WAKSMAN S. A., WOODRUFF H. B., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **45**, 609—614, 1940. — WAKSMAN S. A., HORNING E. S., SPENCER E. L., J. Bact., **45**, 233—248, 1943. — WAKSMAN S.A., Microbial antagonisms and antibiotic substances. N.Y. Commonwealth Fund, 1945. — WHIFFEN A. J., SAVAGE G. M., J. Bact., **53**, 231—240, 1947.

Attivita antibiotica di alcuni dermatofiti

R. CIFERRI

Direttore Istituto Botanico e Laboratorio Crittogamico, Università di Pavia (Comunicazione del Centro di Micopatologia Umana e Comparata, Milano—Pavia)

(1. 6. 1947)

L'esplorazione dell'attività antibiotica di funghi Dermatofiti sembra essere stata, sino ad oggi, piuttosto limitata. A nostra conoscenza, furono primi PECK e HEWITT (1945) a segnalare un antibiotico penicillinosimile in *Ctenomyces mentagrophytes, Trichophyton violaceum, T. tonsurans* ed *Epidermophyton floccosum.* Più recentemente PÄTIÄLÄ (1947) ha accertato l'attività antibiotica sullo Stafilococco dorato (ceppo diverso dello „standard") dei *Sabouradites gallinae, S. lanosus, Ctenomyces asteroides* ed *Epidermophyton floccosum,* contro l'inattività dei*Sabouradites Audouini* e *Trichophyton Schoenleini.* Si noti che la tecnica per la messa in evidenza del potere antibiotico, il mezzo di cultura dei Dermatofiti, la durata d'incubazione (e probabilmente la temperatura), nonchè il ceppo di Stafilococco impiegato, furono diversi nelle esperienze nordamericane e in quelle francesi.

Partendo da dodici specie di Dermatofiti (1) abbiamo voluto controllare la produzione di un qualche principio antistafilococcico in colture su mezzo liquido di varia età, nel sospetto che vi fosse una relazione tra tempo di coltura ed attività antibiotica, su specie in parte già saggiate dagli studiosi di cui sopra, ed in parte — per quel che ci è noto — non controllate.

Tecnica impiegata

La tecnica d'uso è stata quella di VINCENT e VINCENT (1944), da noi impiegata utilmente per l'indagine del potere antibiotico di Licheni (CIFERRI e GIACOMINI, 1948), che consiste nel ritagliari dei dischetti di carta da filtro di 12 mm. di diametro (a mezzo di un foratappi), sterilizzandoli per via termica e conservandoli in tubo chiuso sterile in recipienti con cloruro di calcio. Al momento dell'uso si prelevano con una pinza a punte sterili e si immergono nel liquido di cultura della Crittogama di cui si desidera saggiare il potere antibiotico, e quindi rapidamente si adagiano su capsule all'agar-germi (nel nostro caso, capsule con emulsioni di Stafilococco dorato), preparate con le modalità consuete per il saggio degli antibiotici.

Ogni capsula di 10—12 cm. di diam. permette 5—7 saggi simultanei dell'attività antibiotica, con altrettanti dischetti di carta bibula imbevuta del liquido colturale. Si incuba e si osserva per trasparenze la presenza di un eventuale anello d'inibizione circondante il dischetto, dopo 15 ore d'incubazione delle capsule a 37° C (eventualmente controllando la lattura dopo 24 ore) e misurandone il diametro.

I terreni culturali liquidi impiegati furono due: 1) il solito liquido nutritizio glucoso-nitratato di CZAPEK-DOX (non agarizzato), e 2) una soluzione di Peptone Bacto (Difco) gr. 10 per litro; glucosio (Difco) gr. 50 per litro; autolizzato di Lievito

1) In parte conservati nella Micoteca dei nostri Istituti da vari anni, ed in parte ottenuti dalla Clinica Dermosifilopatica dell'Università di Pavia, diretta dal Prof. G. FALCHI, di più recente isolamento.

Fleischman (A. Thomas) gr. 1 per litro; soluzione nutritizia micronutritiva „A-Z" di HOAGHLAND appena modificata (2) 1 ml. per litro in acqua distillata.

Il ceppo di **Staphylococcus aureus** fu lo „standard" per il saggio degli antibiotici. Non si cerco affatto di modificare il pH del terreno ,nè di tamponarlo. Culture fungine in termo stato al buio a 21° C.

Risultati ottenuti e discussione

Nella tabella seguente sono riportati i dati ottenuti: ogni cifra rappresenta la media di 3 a 6 determinazioni per ogni specie fungina indagata.

TABELLA I. *Attività antibiotica di 12 spp. di Dermatofiti su S. aureus* (alone d'inibizione; media in mm.)

Specie	Soluzione di su Czapek—Dox			su soluzione pepto-glucosata con estratto di lievito, ecc.		
	dopo giorni					
	10	20	30	10	20	30
1) *Epidermophyton interdigitale* (Pr.) Mac Carthy	0	0	0	1,3	2,0	2,3
2) *E. rubrum* Cast.	0	0	1,3	0,7	1,7	2,3
3) *E. inguinale* Sab.	0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,7
4) *E. floccosum* (Harz) Lang.	0	±	0,3	1,3	2,0	2,3
5) *Trichophyton tonsurans* Malm.	±	±	±	0,7	1,0	2,0
6) *T. asteroides* Sab.	0	0	±	0	0,3	1,0
7) *T. gypseum* Bod.	0	±	1,0	0,7	2,0	2,3
8) *Microsporum Audouini* Gruby	0	0	0	0	0	±
9) *Achorion gypseum* Sab.	0	0	0	±	1,0	1,7
10) *A. violaceum* Bloch	±	±	1,3	0	1,7	3,0
11) *A. Schoenleini* (Sab.) Rem.	0	0	0	0	0	±
12) *A. gallinae* (Mégnin) Sab.	0	0	±	0,7	2,3	1,0

± = tracce incerte d'attività.

Dai dati suesposti si deducono le seguenti conclusioni:

1) In soluzione nitro-glucosata di *Czapek-Dox*, l'attività antibiotica dei liquidi di coltura delle specie di Dermatofiti studiate, è sempre molto minore che in soluzione pepto-glucosata con estratto di lievito, ecc.

---

2) La soluzione „A-Z" di HOAGHLAND è data da: gr. 0,5 di Li Cl; gr. 0,1 di Cu SC_4. 5 H_2O; gr. 1,0 di ZnSO; gr. 11,0 di H_3BO_3; gr.1,0 di Al_2 $(SO_4)_3$; gr. 0,5 di Sn Cl_2. $2H_2O$; gr. 7,0 di Mn Cl_2. $4H_2O$; gr. 1,0 di $NiSO_4$. $6H_2O$; gr. 1,0 di Co $(NO_3)_2$. $6H_2O$; gr. 1,0 di TiO_2; gr. 0,5 di KJ; gr. 0,5 di KBr, cui usiamo aggiungere gr. 5,0 di Fe_2 $(C_6H_5O_7)_2$ e gr. 0,5 di $(NH_4)_6$. Mo_7O_{24}. $4H_2O$, il tutto disciolto in 18 litri di acqua distillata.

2) Su Czapek-Dox, 2 spp, sono dubbiamente attive dopo 10 giorni, 1 sp. attiva e 4 spp. dubbiamente attive dopo 20 giorni, e 5 spp. attive e 3 spp. dubbiamente attive dopo 30 giorni. L'attività antibiotica cresce con l'età della coltura (7 spp.) o rimane costante (1 sp.).
3) Su terreno nutritico pepto-glucosato con acqua di lievito ecc., 7 spp. sono attive ed 1 sp. dubbiamente attiva dopo 10 giorni, 10 spp. attive ed 1 sp. dubbiamente attiva dopo 20 giorni, e 10 spp. attive ed 2 spp. dubbiamente attive dopo 30 giorni. L'attività antibiotica aumenta col tempo di coltura in 10 spp., e decresce, dopo massimo, per 2 spp.
4) Varie specie (7 spp.) che non rivelano attività antibiotica nel terreno gluco-nitratato, la rivelano nel terreno pepto-glucosato al lievito.
5) Stabilendo una graduatoria d'attività delle specie saggiate, sotto le nostre condizioni di sperimentazione e dopo 30 giorni di cultura, si ha: a) attività massima = *Achorion violaceum;* b) attività mediocre: *Epidermophyton interdigitale, E. rubrum, E. floccosum, Trichophyton gypseum;* c) attività scarsa: *Epidermophyton inguinale, Achorion gypseum;* d) attività minima: *Trichophyton asteroides, Achorion gallinae;* e) attività dubbia: *Microsporium Audouini* e *Achorion Schoenleini.*
6) L'attività antibiotica — a giudicare delle specie studiate — pare notevolmente diffusa tra i Dermatofiti, almeno rispetto alla Stafilococco dorato, e meriterebbe di essere meglio studiata; nel complesso, i dati da noi ottenuti concordano con quelli degli studiosi che ci hanno preceduto in questa ricerca. L'attività antibiotica rispetto allo Stafilococco dorato (e sotto le nostre condizioni di sperimentazione) era posseduta dalla quasi totalità dei Dermatofiti studiati, ma si rivela solo o più facilmente su terreno liquido pepto-glucosato con acqua di lievito, rispetto allo Czapek-Dok liquido. L'attività varia sensibilmente con la durata della cultura, generalmente crescendo da 10 a 30 giorni d'incubazione.

Summary

Under our environmental conditions and with Vincent's technic, against **S. aureus**, the antibiotic activity appears to be diffused amongs Dermatophytae (at least 10, and may be 12 spp., on 12 spp. tested). It is revealed only and (or) better on pepto-glucosed liquid medium with autolized yeast and Hoaghland's „A-Z" modified solution than on nitrate-glucosed Czapek-Dox liquid medium. The activity is variable according the age of culture, as a rule increasing from 10 to 30 days.

Letteratura citata

CIFERRI R e GIACOMINI V. (1947) Il Farmaco, 1 (In stampa)
PäTläLä R. (1947). Ann. de Parasit. Hum. Comp., 22 (1—2) 105—107.
PECK S.M. and HEWITT W.L. (1945) Public Health Rep., 60 (2603), 148—153.
VINCENT V. G .and VINCENT H. W. (1944) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 55, 162—164.

Studi sulla biologia dei dermatomiceti

Nota II°. Capacità di assimilazione degli idrati di carbonio ed attività fermentative glicolitiche di alcuni dermatomiceti

P. PINETTI

Dalla Clinica Dermosifilopatica, Università di Cagliari

(10. 6. 1947)

In una nostra precedente nota comunicata alla Società di Biologia Sperimentale (1946) e pubblicata per esteso nel Volume di scritti in Onore del Prof. A. SERRA (Cagliari. Tip. Editoriale 1947), abbiamo precisato il comportamento di un considerevole numero di ceppi e di specie dermatomicetiche di fronte a diverse fonti di azoto e le loro attività enzimatiche proteolitiche. A complemento di questi dati, la cui utilità ai fini di una differenziazione di genere e talora di specie non ci sembra trascurabile, comunichiamo ora i risultati di ulteriori ricerche con le quali abbiamo inteso studiare, almeno in alcuno dei molteplici aspetti, il complesso delle capacità assimilative e delle attività fermentative di alcune specie dermatomicetiche nei confronti di alcuni idrati di carbonio.

Il problema della utilizzazione degli idrati di carbonio da parte dei dermatomiceti è stato fino ad oggi affrontato molto parzialmente con assai limitati intenti sperimentali. Fatta astrazione per un modesto gruppo di indagini orientate verso un più preciso studio del metabolismo di alcuni dermatomiceti (vedi ad esempio gli studi di CERRUTI e VERZOLA sulla glicolisi dello *Sporotrichum* Linch e quelle di VERSARI sul metabolismo del *Tricophyton violaceum)*, le ricerche di cui abbiamo potuto trovare notizia nella letteratura, si limitano generalmente allo studio delle attività fermentative glicolitiche basato su di una tecnica sperimentale che sfrutta come indice di avvenuta glicolisi la produzione di gas e l'acidificazione del mezzo colturale: è il classico metodo della fermentazione degli zuccheri, largamente usato nella tecnica batteriologica, che viene integralmente applicato allo studio dei dermatomiceti. I risultati ottenuti dai vari ricercatori si riferiscono perlopiù a ricerche compiute su di un numero assai limitato di ceppi ed appaiono molto spesso discordanti. Viene riferito infatti da alcuni ricercatori (HOPKINS e JAMAMOTO, BODIN, KAPUSZINSKI, ecc.) che in linea generale i dermatofiti sono capaci di attaccare tra i monosaccaridi il glucosio, il levulosio ed il mannosio, ma non l'arabinosio e lo xilosio; tra i disaccaridi il maltosio, ma non il lattosio ed il saccarosio. BODIN descrive l'esistenza nei „funghi delle tigne" di un'amilasi che scinde l'amido in destrina ed in maltosio. Le ricerche di GRIGORAKI e DAVID tenderebbero in contrapposto alle precedenti a dimostrare invece una scarsa attività glicolitica nei dermatomiceti; secondo questi autori l'*Achorion violaceum* ad esempio non fermenterebbe affatto gli idrati di carbonio, i *Tric. lacticolor* e *radians* fermenterebbero leggermente il glucosio ed il mannosio, mentre il *Microsporum canis* agirebbe in modo abbastanza attivo su mannosio, galattosio, lattosio, amido e glicerina.

L'utilizzazione degli idrati di carbonio avviene in misura diversa a seconda dei tipi di dermatomiceti. Secondo la MALLINCKRODT—HAUPT il

maltosio sarebbe tra gli zuccheri il più assimilabile, il saccarosio il meno, perquanto anche questo zucchero consenta uno sviluppo colturale soddisfacente. *Il Tric. violaceum,* il *Tric. rosaceum,* i *Tric. faviformi „ocraceum"* ed *„album,* gli *Epidermophyton* e l'*Achorion Schönleini* utilizzano i disaccaridi attraverso processi glicolitici assai lenti; il *Microsporum lanosum* ed il *„fulvum"* i *Tric. gipseum, „rubrum"* e *„interdigitale"* e gli *Achorion gallinae* e *„quinqueanum"* danno luogo invece ad una glicolisi assai rapida.

La condotta sperimentale attraverso la quale i diversi Autori sono giunti ai suddetti risultati non è sempre immune da critiche. I processi glicolitici che si svolgono nelle colture dei dermatomiceti nelle comuni condizioni di esperimento, sono in generale contenuti entro limiti quantitativamente piuttosto modesti. Nelle colture di dermatomiceti in acqua peptonata + idrati di carbonio usate per le comuni prove di fermentazione, non si giunge come per molti batteri e per altri miceti ad una produzione di gas controllabile con mezzi macroscopici; la fermentazione degli zuccheri è denunciata solo dal viraggio del tornasole per acidificazione del substrato. E noto d'altra parte dalle ricerche di diversi studiosi (tra cui particolarmente interessanti quelle di CERRUTI e di VERZOLA) che molti dermatomiceti nel processo di demolizione delle proteine del substrato danno luogo alla formazione di sostanze a reazione alcalina che accumulandosi nel mezzo colturale ne spostano sensibilmente il pH. E' facile comprendere come questa alcalinizzazione del mezzo possa mascherare in parte o del tutto la scarsa produzione di sostanze a reazione acida legata ai processi glicolitici; da qui la mancanza di viraggio del tornasole anche là dove in realtà si è determinata una fermentazione glicolitica.

Qualche Autore (HOPKINS e JAMAMOTO) ha cercato — è vero — di ovviare a questo inconveniente utilizzando terreni privi di peptone; i risultati così ottenuti non sono però molto più convincenti di quelli conseguiti con la tecnica classica.

La constatazione della insufficenza e dell'inadeguatezza delle comuni tecniche fin qui usate per lo studio della glicolisi nei dermatomiceti, ci ha spinto ad orientare le nostre ricerche verso una condotta sperimentale che consentisse di eliminare le succitate cause di errore e di studiare l'utilizzazione degli idrati di carbonio fuori dell'influenza perturbatrice di fattori secondari. Il metodo auxanografico di BEIJERINK che con opportune modificazioni ci aveva dato risultati soddisfacenti in nostri precedenti studi sull'utilizzazione delle sostanze proteiche, ci è parso rispondere con sufficente esattezza alle succitate esigenze. Accanto al classico metodo della fermentazione degli idrati di carbonio (acqua peptonata al 2% + idrati di carbonio + tintura di tornasole) abbiamo quindi impiantato una serie di ricerche auxanografiche secondo la tecnica che viene precisata nelle righe seguenti.

Tecnica

La tecnica seguita in queste nostre richerche è sostanzialmente sovrapponibile nelle linee fondamentali a quella già da noi adottata in precedenti ricerche e precisata nei suoi dettagli nelle note già citate alle quali rimandiamo chi voglia più ampi particolari. Ci limitiamo qui per brevità a riferire gli elementi fondamentali.

La capacità di assimilazione degli idrati di carbonio da parte dei diversi ceppi dermatomicetici in esame venne in tutti i casi saggiata con il metodo auxanografico di Beijerink da noi opportunamente modificato in rapporto alle particolari esigenze delle ricerche sui dermatomiceti. Il substrato base utilizzato è così costituito:

Solfato ammonico gr. 0,5

Fosfato monopotassico	gr. 0,1
Solfato di magnesio	gr. 0,05
Acqua distillata	gr. 100

A questo terreno vennero aggiunti nella proporzione dell' 1 % i vari idrati di carbonio da saggiare (glucosio, galattosio, maltosio, lattosio, saccarosio, amido). In una parte delle ricerche al terreno così allestito venne aggiunto in ragione del 2 % agar che si ebbe cura di lavare accuratamente con alcool e poi con acqua onde allontanare eventuali sostanze estranee. La sterilizzazione dei tubi venne praticata per tindallizzazione per tre giorni consecutivi.

L'apprezzamento dell' utilizzazione o meno dei vari idrati di carbonio da parte dei diversi stipiti in esame venne basato in una parte delle ricerche sul rilievo esatto del peso della coltura ed in un'altra — la maggiore — sull'apprezzamento diretto „de visu" della massa colturale sviluppata in un determinato periodo di tempo nei confronti dei controlli. Come abbiamo precisato in una nota precedente il metodo della pesata apparentemente più preciso è quello che in ultima analisi è soggetto alle maggiori cause di errore e non presenta vantaggi sostanziali sul più semplice metodo dell'osservazione diretta dello sviluppo colturale sia in terreno liquido che in terreno solido. Il maggior numero delle nostre osservazioni è stato compiuto su colture allestite su terreno solido.

L'attività fermentative sugli idrati di carbonio è stata studiata con il classico metodo riportato da tutti i trattati elementari di tecnica batteriologica. Su di esso non è quindi il caso di dilungarci.

Il rilievo del viraggio del tornasole non è stato sempre agevole: nelle specie fungine che elaborano pigmenti l'apprezzamento fu sempre indaginoso, come pure ci fu difficile interpretare giustamente gli apparenti viraggi di colore del tornasole che si osservano in specie che come ad esempio il tr. fumatum e certi tr. crateriformi determinano nell'acqua peptonata semplice un considerevole cambiamento del colore che da paglierino diventa nettamente bruno rossiccio.

Il nostro materiale di studio è costituito in grandissima prevalenza da stipiti di recentissimo isolamento e comunque non ancora adattati alla vita su terreni di coltura artificiali.

Sono stati studiati complessivamente 94 ceppi dermatomicetici e precisamente:

Microsporum fulvum	1
Microsporum Audouini	1
Microsporum lanosum	2
Achorion Schönleini	2
Epidermophyton inguinale	10
Tricophyton violaceum	13
Tricophyton rosaceum	5
Tricophyton cerebriforme	15
Tricophyton gipseum	17
Tricophyton plicatile	5
Tricophyton fumatum	4
Tricophyton interdigitale	3
Tricophyton sp.	16

I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle I° e II°.

Nelle seguenti tabelle I° e II° abbiamo adottato per la notazione dei risultati i seguenti criteri. Attività fermentativa o capacità assimilativa verso i vari idrati di carbonio normale, intensa o assente sono rispettivamente contrassegnate con +, ++, —. Nell'indice auxanografico (I.A.) e nell'indice enzimatico (I.E.) abbiamo voluto riasumere graficamente per facilità di confronto le diverse attività dei singoli ceppi. La presenza delle singole capacità o attività è contrassegnata con cifre dall'1 al 6 e dall'1 all'8 che corrispondono ai diversi idrati di carbonio nell'ordine seguito nelle tabelle, mentre la mancanza è contrassegnata con la cifra O.

Tabella I°

CEPPO	Auxanogramma						Attivita Fermentative								Indice	
	Glucosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Saccarosio	Amido	Glucosio	Levulosio	Mannosio	Galattosio	Lattosio	Maltosto	Saccarosio	Amido	Auxanografico	Enzimatico
ACHORION SCHöNLEINI																
107B	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	000000	12340600
107	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	000000	12340000
EPIDERMOPHYTON INGUINALE																
491	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	123456	00040000
450	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	123450	12000000
454	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—	+	+	—	123450	10040670
447	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	123450	10040000
436	+	+	++	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	123050	00000000
427	—	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	023050	12340600
422	—	+	++	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	023050	12340600
435	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	023050	00000000
432B	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	003050	00000000
469	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	000056	10345670
MICROSPORUM																
Audouini 418	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	100056	12340000
Fulvum 7626	++	—	—	—	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	100056	10000000
Lanosum 429	+	—	—	—	—	++	+	+	+	+	—	+	—	—	100006	12340600
„ 76	++	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	100006	00000000
TRICOPHYTON VIOLACEUM																
442	+	—	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	—	—	103050	02340600
438	+	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	103000	12345000
442B	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	100000	02340600
7030	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	100000	00005070
172	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	003000	12340600
440	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	003000	12345600
441	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+	—	000000	12345078
32	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	000000	12340600
453	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	000000	12305600
448	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—	000000	12305000
415	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	000000	12300600
439	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	000000	12300600
428	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	000000	02340000
TRICOPHYTON ROSACEUM																
494	++	+	++	++	++	—	—	+	—	+	—	—	—	—	123450	02040000
496	+	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	—	123050	02000000
413	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	123000	12345670
512	—	+	+	—	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	023050	10340678
464	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	003000	10340000

Tabella I° (continuazione)

CEPPO	Auxanogramma						Attivita Fermentative								Indice	
	Glucosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Saccarosio	Amido	Glucosio	Levulosio	Mannosio	Galattosio	Lattosio	Maltosio	Saccarosio	Amido	Auxanografico	Enzimatico
TRICOPHYTON PLICATILE																
498	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	123456	12345670
19	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	123456	00000000
495	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	123056	12345670
497	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	123056	12345078
198	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	123056	00040000
TRICOPHYTON CEREBRIFORME																
488	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	123456	12340000
466	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	123456	12040608
489	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	123456	12040608
484	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	123456	12040008
478	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	123456	12005600
481	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+	—	123050	12340670
479	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	123056	12340670
473	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	123056	10305670
487	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	123056	12045600
480	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	123056	12045600
485	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	123056	12040000
467	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	—	—	—	123056	10305000
465A	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	—	+	+	—	123056	10300670
472	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—	—	123056	10000600
471	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—	—	+	120050	12305008
TRICOPHYTON GIPSEUM																
Granulosum 400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	123456	12345670
Persicolor 457	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	123456	12340670
Granulosum 419	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	123456	12005600
„ 410	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	123456	10345000
Asteroides 430	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	123456	00000000
Persicolor 446	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	123056	12340000
„ 475	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—	123056	12300070
Granulosum 476	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	123056	10305670
„ 477	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	123056	10005678
„ 414	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	123050	00000000
„ 12A	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	—	—	123050	10345600
Farinulentum 461	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	123050	10305078
Granulosum 462	+	+	+	—	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	123050	00340070
Farinulentum 470	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	023050	10000000
„ 458	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	000000	12340600
Granulosum 417	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	000000	00000000
„ 732	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	000000	00000000
TRICOPHYTON FUMATUM																
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	123456	12340600
317	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	123456	12040000
40	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	123056	12300000
492	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	123056	12000000

Tabella I° (continuazione)

	Auxanogramma						Attivita' Fermentative								Indice	
	Glucosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Saccarosio	Amido	Glucosio	Levulosio	Mannosio	Galattosio	Lattosio	Maltosio	Saccarosio	Amido	Auxanografico	Enzimatico
TRICOPHYTON Sp.																
500	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	123456	12040600
463	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+	—	123456	12005070
416	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	123456	00000000
431	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	123056	10005670
483	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—	123056	10000608
502	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	123056	00340000
445	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	123056	00000000
43	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	123056	00000000
501	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	123050	12045670
4505	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	123050	12340608
426	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	123050	02345000
2540	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	120400	00340670
411	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	000000	00000000
412	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	003400	00000000
424	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	003000	12005000
460	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	000000	00000000
TRICOPHYTON INTERDIGITALE																
437	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	123050	12005000
406	+	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	120000	10345600
55S	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	100056	12345670

Tabella II°

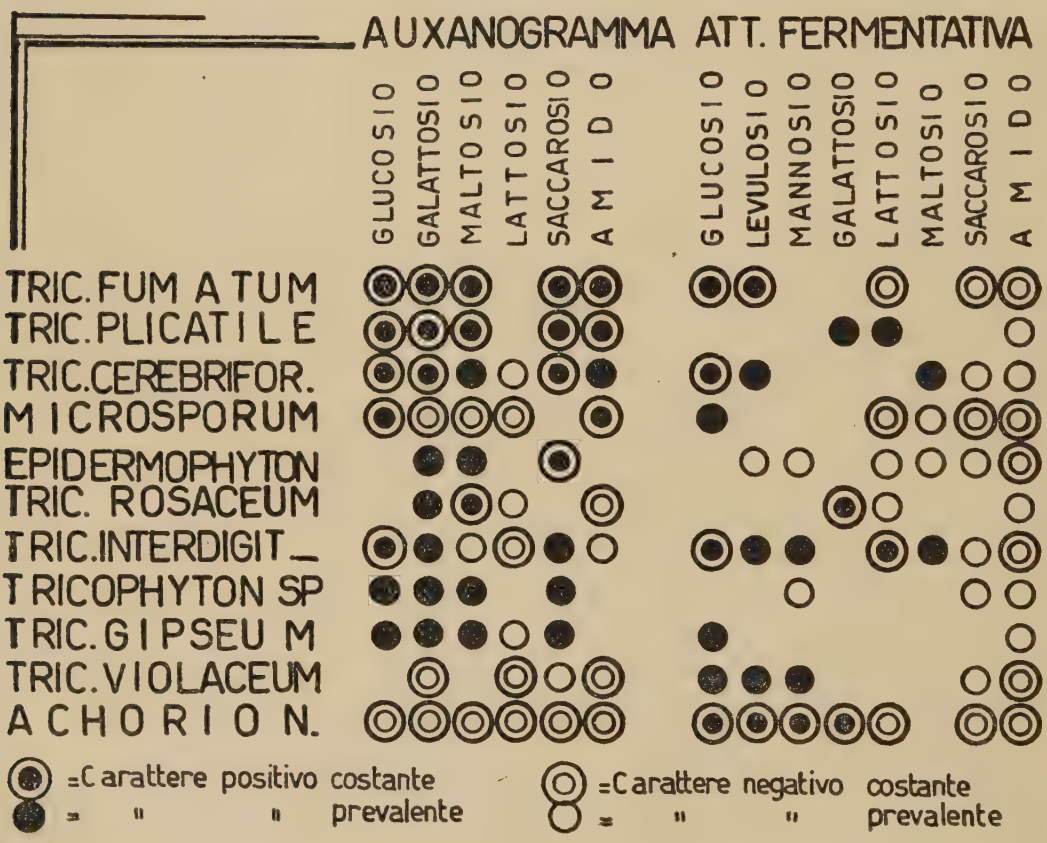
	Auxanogramma						Attivita' Fermentative								Indice Prevalente	
	Glucosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Saccarosio	Amido	Glucosio	Levulosio	Mannosio	Galattosio	Lattosio	Maltosio	Saccarosio	Amido	Auxanografico	Enzimatico
Achorion	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	50	0	0	000000	12340000
Epidermoph.	50	80	90	40	100	20	60	30	30	60	10	40	20	0	023050	10040000
Microsporum	100	0	0	0	50	100	75	50	50	50	0	25	0	0	100006	10000000
Tric. violac.	39	0	39	0	7	0	69	92	92	61	46	61	15	0	000000	12340600
Tric. rosac.	60	80	100	20	60	0	60	60	60	100	20	40	40	20	123050	12340000
Tric. cerebr.	100	100	93	33	100	86	100	73	46	60	40	66	26	26	123056	12040600
Tric. fumat.	100	100	100	50	100	100	100	100	50	50	0	25	0	0	123056	12000000
Tric. gips.	76	80	80	29	80	52	70	35	59	41	41	41	41	11	123050	10000000
Tric. plicat.	100	100	100	40	100	100	60	60	60	80	80	40	60	20	123056	12340000
Tric. Sp.	76	76	88	38	76	50	56	50	23	38	38	38	23	19	123050	00000000
Tric. interd.	100	66	33	0	66	33	100	66	66	60	100	66	33	0	120050	12345600

Nella seguente tabella II° abbiamo voluto raggruppare per una più agevole consultazione e per favorire una miglior visione d'assieme dei risultati i dati esposti nella precedente tabella. Nella tabella II° il lettore può rilevare la frequenza percentuale con cui nelle nostre ricerche è stata riscontrata per ogni singola specie o genere di dermatomiceti la capacità di assimilare o di fermentare i diversi idrati di carbonio.

Per maggior chiarezza di documentazione, i medesimi elementi sono esposti graficamente nello schema I°.

Schema I°

Ai dati schematicamente esposti nelle tabelle I° e II° e nello schema I°, riteniamo di dover aggiungere alcune precisazioni in dettaglio sul quadro complessivo delle attività glicolitiche e glicoassimilative delle singole specie dermatomicetiche prese in esame.



Achorion Schönleini. Questa specie, di cui purtroppo ci è stato possibile per ora studiare solo un piccolo numero di ceppi, è caratterizzata in modo costante da un peculiare comportamento che si ripete senza eccezioni. Non è dimostrabile nelle nostre condizioni di esperimento alcuna capacità di assimilazione nei riguardi degli zuccheri saggiati: l'auxanogramma appare costantemente negativo (I.A. = 000000). L'attività fermentativa è invece particolarmente estesa e costante esplicandosi nella

totalità dei ceppi su glucosio, levulosio, mannosio e galattosio, mai su lattosio, saccarosio ed amido (I. E. = 12340000).

L'antitesi almeno apparente di comportamento tra le prove di assimilazione e quelle di fermentazione merita un attento esame. Le condizioni in cui si svolgono nei nostri esperimenti la prova dell'attività assimilativa e quelle dell'attività fermentativa sono sostanzialmente diverse; esse possono quindi fino ad un certo punto renderci ragione del discordante comportamento osservato. La determinazione auxanografica si compie infatti su di un terreno nutritizio in cui l'azoto è presente in quantità limitata e solo sotto forma di sale ammonico, mentre invece le prove di fermentazione vengono praticate su di un terreno ricco di azoto sotto forma proteica. Ci limitiamo per ora a sottolineare questo curioso comportamento che vedremo ripetersi sia pure in modo non così evidente in specie dermatomicetiche botanicamente assai vicine all'*achorion*, senza poter permetterci di esprimere sul suo reale significato un parere definitivo.

Microsporum. Il comportamento delle tre specie microsporiche da noi prese in same nel corso di queste ricerche *(lanosum, fulvum ed Audouini)* si sovrappone in un quadro abbastanza caratteristico che può essere considerato come molto verosimilmente peculiare per il genere *microsporum*. In tutti i ceppi esaminati è evidente una netta capacità di assimilazione nei riguardi degli altri zuccheri è oltremodo capriccioso ed irregolare utilizzare galattosio, maltosio e lattosio (I. A. = 100006). L'attività fermentativa appare sempre estremamente ridotta: manca in tutti i ceppi ogni capacità di fermentare lattosio e saccarosio e di idrolizzare l'amido, mentre la maggior parte dei ceppi fermenta il glucosio; il comportamento nei riguardi degli altri zuccheri è oltremodo capriccioso ed irregolare (I. E. = 10000000).

Epidermophyton inguinale. Il genere *epidermophyton* è caratterizzato nello nostre ricerche dal seguente comportamento che si ripete nella grande maggioranza dei ceppi presi in esame. L'auxanogramma documenta una modesta attività assimilativa che si esplica con notevolissima frequenza su galattosio e maltosio e costantemente su saccarosio (I. A. = 023050). L'attività fermentativa è assai scarsa: nella maggioranza dei ceppi non si rileva fermentazione alcuna di levulosio, galattosio, lattosio, maltosio e saccarosio; in nessun caso si è osservata saccarificazione dell'amido (I. A. = 10040000).

E da tener presente che nélle prove di fermentazione praticate su questa specie dermatomicetica la quasi costante produzione di pigmento giallo ostacola molte volte non poco un esato apprezzamento dei risultati.

Tricophyton fumatum. Osserviamo in questa specie un auxanogramma nettamente positivo (I. A. = 123056). Tutti i ceppi mostrano chiaramente una netta capacità di utilizzare gli zuccheri saggiati ad eccezzione del lattosio che appare utilizzato solo in una metà dei ceppi. L'attività fermentativa è costatte nei riguardi del glucosio e del levulosio, assai irregolare nei riguardi del mannosio, galattosio e maltosio e costantemente negativa nei riguardi del lattosio, saccarosio ed amido (I. E. = 12000000).

Tricophyton plicatile. Anche in questa specie l'auxanogramma è in modo assolutamente costante nettamente positivo. Nei riguardi del lattosio la capacità di assimilazione è rilevabile solo in un numero assai limi-

tato di ceppi (I. A. = 123056). L'attività fermentativa è assolutamente capricciosa ed irregolare e non fornisce quindi elementi degni di rilievo.

Tricophyton cerebriforme. L'attività assimilativa di questa specie è ben evidente e costante. Tutti i ceppi utilizzano il glucosio, galattosio e saccarosio, la gran maggioranza di essi utilizza anche l'amido, quasi tutti si dimonstrano incapaci di utilizzare il lattosio (I. A. = 123056). L'attività fermentativà è contenuta entro limiti molto modesti: tutti i ceppi fermentano il glucosio, molti il levulosio ed il maltosio. Irregolare il comportamento verso gli altri zuccheri (I. E. = 12040600).

Tricophyton gipseum. L'attività assimilativa di questa specie non si discosta sostanzialmente da quella dei tricophyton succitati se non per una relativa incostanza di comportamento. La grande maggioranza dei ceppi si dimostra capace di assimilare glucosio, galattosio, maltosio e saccarosio; solo una piccola parte di essi assimila l'amido (I.A. = 123050). L'attività fermentativa è assolutamente incostante ed irregolare solo il glucosio viene intaccato con una certa frequenza (I. E. = 10000000).

Tricophyton interdigitale. Anche in questa specie l'attività assimilativa non è molto dissimile da quella osservata negli altri *tricophyton* a coltura polverulenta sin quì presi in esame. L'auxanogramma registra una costante capacità di assimilazione per il glucosio; solo una parte dei ceppi utilizza invece il galattosio ed il saccarosio. Nessun ceppo assimila il lattosio e pochissimi il maltosio e l'amido (I. A. = 120050).

Tricophyton sp. Sono riuniti in questo gruppo alcuni ceppi con caratteri botanici macroscopici e microscopici uniformi, ma non ben definiti, che non consentono una sicura identificazione. Essi sono con ogni verosimiglionza da includere nel gruppo dei paracrateriformi. Il comportamento biologico di questi ceppi è in linea generale quello dei tricophyton a coltura vellutata o polverulenta già studiati. La netta maggiornaza dei ceppi è capace di assimilare glucosio, galattosio, maltosio e saccarosio, una metà circa utilizza l'amido, pochi il lattosio (I. A. = 123050). L'attività fermentativa è sempre assai scarsa ed assolutmente incostante (I. E. = 00000000).

Tricophyton rosaceum. L'attività assimilativa di questa specie è simile in tutto a quella delle specie precedenti. L'auxanogramma è nella maggioranza dei ceppi di tipo intermedio: positivo per glucosio, galattosio, maltosio e saccarosio, negativo per il lattosio e per l'amide (I. A. = 123050). L'attività fermentativa è assolutamente incostante ed irregolare. Tutti i ceppi intaccano il galattosio, poco più della metà di essi glucosio, levulosio, e mannosio (I. E. = 12340000).

Tricophyton violaceum. Il comportamento di questa specie si discosta nettamente da quello degli altri *tricophyton* esaminati. L'auxanogramma nella maggioranza dei ceppi è negativo: solo una piccola parte dei ceppi utilizza il glucosio ed il maltosio, solo pochissimi ceppi il saccarosio (I. A. = 000000). La grande maggioranza dei ceppi fermenta glucosio, levulosio, mannosio, galattosio e maltosio ed il saccarosio; nessuno è capace di idrolizzare l'amido (I. E. = 12340600).

Un esame dei diversi elementi che abbiamo fin quì esposto nei loro

dettagli e ceh il lettore troverà riassunti nello schema I°, ci porta a trarre dai risultati delle nostre esperienze le seguenti conclusioni.

Nelle condizioni sperimentali realizzate nel metodo auxanografico da noi adottato — coltura cioè in terreno privo di proteine ed in cui l'azoto è presente solo sotto forma di sale ammonico — l'attività assimilativa dei dermatomiceti da noi presi in esame presenta nelle varie specie diversità di comportamento su cui ci par utile richiamare l'attenzione.

Gli *Achorion* della specie *„Schönleini"* appaiono costantemente caratterizzati da un'auxanogramma nettamente negativo (000000): i miceti di questa specie non sono capaci di utilizzare attivamente per il loro sviluppo i sei idrati di carbonio da noi saggiati.

I *Microsporum* delle specie prese in esame *(fulvum, lanosum* ed *Audouini)* presentano costantemente un auxanogramma intermedio (100006) in cui dei sei idrati di carbonio saggiati solo il glucosio e l'amido appaiono utilizzati nella totaltà dei casi, mentre manca ogni capacità di utilizzazione per il galattosio, maltosio e lattosio.

Ben poco ci dice di conclusivo l'esame dell'auxanogramma presentato dai diversi ceppi di *Epidermophyton* studiati. Unico rilievo di un certo interesse: la costante capacità di questa specie di assimilare il saccarosio.

Nel vasto gruppo di *Tricophyton* presi in esame, il comportamento è orientato verso tre modalità del tutto diverse. In un primo gruppo di specie (*Tr. fumatum, Tr. plicatile* e *Tr. cerefriborme)* l'auxanogramma è costantemente positivo (123056): queste specie utilizzano attivamente ed in modo costante glucosio, galattosio, maltosio, saccarosio ed amido; in nessun caso o eccezzionalmente il lattosio. Un secondo gruppo comprende specie (*Tr. interdigitale, Tr. gipseum* e *Tr. rosaceum)* in cui l'auxanogramma è positivo nella grande maggioranza dei casi (123050) con capacità di utilizzazione di tutti gli idrati di carbonio ad eccezzione del lattosio e spesso dell'amido. Un terzo gruppo è costituito da specie *(Tr. violaceum)* in cui l'auxanogramma è negativo (000000) con capacità assimilativa assente per tutti o quasi tutti gli zuccheri.

Il metodo auxanografico utilizzato con le modificazioni tecniche da noi apportate, ci ha permesso dunque di mettere in evidenza con una discreta regolarità ed uniformità di risultati, differenze sostanziali di comportamento nell'utilizzazione dei vari idrati di carbonio da parte dei diversi generi di dermatomiceti. Tali differenze, che noi almeno per ora siamo ben lontani dal voler considerare come caratteri assoluti e peculiari, contribuiscono però assieme a quelle già da noi segnalate in un precendente lavoro per l'attività proteolitica, a segnare nelle sue linee più grossolane la fisionomia biologica delle diverse specie dermatomicetiche.

Lo studio delle attività enzimatiche fermentative offre invece ben scarsi elementi degni di rilievo. Unici reperti di un certo interesse, perquanto anch'essi di significato molto relativo, sono la mancanza negli *Epidermophyton* di un'attività fermentativa evidente e la costante o assai frequente presenza nell'*Achorion Schönleini* e nel *Tr. violaceum* di una netta capacità di fermentare glucosio, levulosio, mannosio e galattosio.

L'incostanza e spesso l'assoluta disparità dei risultati ottenuti anche da diversi ceppi di una stessa specie, ci fanno ritenere di assai scarso valore questo mezzo di esplorazione delle attività biologiche dei dermatomiceti. Il comportamento prevalente delle attività fermentative da noi riscontrato discorda comunque nettamente in linea generale da quello descritto dai vari Autori che ci precedettero in queste ricerche.

In base a quanto riferiscono HOPKINS e JAMAMOTO e la MALLINCKRODT

—HAUPT, il genere *Achorion* sarebbe caratterizzato da una modesta attività glicolitica e sarebbe capace solo di una lenta fermentazione del mannosio, glucosio e fruttosio. Tali reperti discordano quindi sostanzialmente dai nostri che tenderebbero a dimostrare all' opposto una glicolisi piuttosto attiva. Lo scarso numero di ceppi di questa specie che fino ad ora ci è stato possible prendere in esame ci lascia un po' perplessi sul valore definitivo di questo nostro reperto che comunque si ripete invariato in tutti i ceppi esaminati.

I dati riferiti nella letteratura a proposito delle attività fermentative del genere *Microsporum* si riferiscono alle specie *„lanosum"* e *„fulvum"* che sarebbero capaci di determinare una rapida glicolisi dei disaccaridi (MALLINCKRODT—HAUPT), alla specie *canis* capace di intaccare mannosio, galattosio e lattosio (GRIGORAKI e DAVID) ed all'*„Audouini"* che scinderebbe rapidamente mannosio, glucosio e fruttosio (HOPKINS e JAMAMOTO). Nel loro complesso tali elementi concorderebbero nel documentare l'esistenza di una discreta attività fermentativa glicolitica che non trova però conferma nei risultati delle nostre ricerche dai quali appare al contrario un'attività glicolitica irregolare e modesta.

Le ricerche compiute sui dermatomiceti del genere *Tricophyton* hanno portato diversi ricercatori a risultati assai vari da specie a specie. Sarebbero infatti dotati di una modesta attività sugli zuccheri le specie *„radians"*, *„lacticolor*, *„crateriforme"* (GRIGORAKI e DAVID), *„acuminatum"* e *„cerebriforme"* (HOPKINS e JAMAMOTO) e di una intensa attività la specie *„gipseum"* (HOPKINS e JAMAMOTO) mentri si sarebbe dimostrata del tutto inattiva la specie *„violaceum"* (GRIGORAKI e DAVID). Anche su questo punto le nostre ricerche ci forniscono dati almeno in parte discordanti, chè se l'attività glicolitica della maggior parte delle specie di *Tricophyton* a coltura polverulenta o vellutata è anche per noi modesta ed incostante, quelle della specie *„violaceum"* è con particolare frequenza attiva su glucosio, levulosio e mannosio."

Il genere *Epidermophyton* secondo ricerche di HOPKINS e JAMAMOTO sarebbe capace di scindere rapidamente mannosio, glucosio e fruttosio con produzione di acido; ciò non trova assolutamente conferma nelle nostre ricerche.

I dati che abbiamo ricavato dalla nostra esperienza e quelli desunti dalla letteratura ci pare documentino in maniera sufficentemente chiara attraverso la loro estrema disparità, lo scarso valore dell'esame della fermentazione degli idrati di carbonio applicato, sia pure con accorgimenti tecnici particolari (terreno privo di peptone), allo studio della biologia dei dermatomiceti.

Ci siamo volutamente limitati sin quì a segnalare obbiettivamente e semplicemente alcuni interessanti dati di fatto emersi da ricerche sulla biologia dei dermatomiceti che sono appena impostate; sarebbe del tutto prematuro ed azzardato voler trarre da risultati parziali come quelli che abbiamo riportato deduzioni di indole generale. Studi in corso ci consentiranno — lo speriamo — di stabilire in seguito le condizioni precise nelle quali ogni singola specie fungina esplica nel modo più evidente e più costante le sue attività glicolitiche e di precisarne maggiormente attraverso tecniche più esatte il comportamento.

E tutto un vasto campo di ricerca che si apre dinnanzia a noi e che merita di essere considerato con interesse.

Autoriassunto

L'A. ha studiato le attività glicoassimilative e glicolitiche di 94 ceppi di dermotomiceti di recentissimo isolamento (4 *Microsporum, 2 Achorion Schönleini,* 10 *Epidermophyton inguinale* e 78 *Tricophyton* delle specie *violaceum, cerebriforme, gipseum, plicatile, fumatum, interdigitale,* ecc.).

Sono stati seguiti in tali ricerche il metodo auxanografico di Beijerink opportunamente modificato per le particolari esigenze dello studio dei dermatomiceti ed il classico metodo per la fermentazione degli idrati di carbonio.

Il metodo auxanografico ha permesso di mettere in evidenza sostanziali differenze di comportamento tra i quattro generi di dermatomiceti presi in esame *(Microsporum, Achorion, Epidermophyton* ed *Tricophyton),* differenze che si ripetono in alcuni casi con assoluta costanza o con notevole frequenza nei diversi ceppi della stessa specie esaminati, ma che secondo l'A. sarebbe ancora prematuro ed azzardato voler considerare definitivamente come caratteri assoluti peculiari di un determinato genere o specie.

Risultati assai irregolari e di significato molto scarso ha dato invece l'esame dell'attività fermentativa sugli idrati di carbonio.

Summary

The Author studied the glycoassimilative and glycolythic activities of 94 strains of very recent isolated dermatomycetes (4 *Microsporum,* 2 *Achorion,* 10 *Epidermophyton inguinale* and 78 *Tricophyton violaceum, cerebriforme, gipseum, plicatile, fumatum,* ecc.).

Beijerink's auxanographic method was followed in such researches suitably modified for the particular requirements in the study of dermatomycetes as well as the classical method for the fermentation of carbonium hydrates.

The auxanographic method enabled to point out the striking difference in the behaviour between the four genus of dermatomycetes tested (*Microsporum, Achorion, Epidermophyton* and *Tricophyton)* differences which occur in many cases with an absolute constancy or remarkable frequency for different strains tested of sam genus or species. According to the A. itz would be still before time and rather hazardous to state definitively these differences as absolute characters peculiar for a genus or species.

The examination of fermentative activity on the carbonium hydrates gave on the contrary irregular or small important results.

Résumé

L'A. a étudié les activitées glycoassimilatives et glycolithiques de 94 souches de dermatomycetes tout recemment isolées (4 *Microsporum,* 2 *Achorium Schöleini,* 10 *Epidermophyton* et 78 *Tricophyton* des espèces *violaceum, cerebriforme, gipseum, plicatile, fumatum, interdigitale,* etc.).

On a employé dans ces recherches la méthode auxanographique de Beijerink modifiée en vue des particulières exigéances de l'étude des dermatomycetes et la methode classique de la fermentation des hydrates de carbon.

A l'aide de la méthode auxanographyque l'A. a réussi à mettre en évidance parmi les quatre genres de dermatomycetes examinés (*Microspo-*

rum, Achorium, Epidermophyton, et *Tricophyton*) des differences substantielles de comportement que dans certains cas se répètent avec une absolue constance ou une considérable fréquence dans les diverses souches de la même espèce examinées. L'A. croit cependant qu'il serait encore prémature et hazardeux de considérer ces differences comme des caractères absolus particuliers à chaque genre ou espèce.

L'examen de l'activité fermentative sur les hydrates de carbon a donné des résultats tout à fait irréguliers et de signification assez restreinte.

Bibliografia

BLUMENTHAL e MALLINCKRODT—HAUPT, Arch. f. Derm. u. Siph. *144.* 458. 1923. — BODIN, Ann. de Derm. et Siph. 596. 1907. — CERRUTI e VERZOLA, Giorn. Ital. di Derm. e Sif. *77.* 37. 1936. — GRIGORAKI e DAVID, Comptes Rend. Soc. Biol. *128.* 887. 1938. — *id. id.* Comptes Rend. Soc. Biol. *130.* 203. 1939. — *id. id.* Comptes Rend. Soc. Biol. *131.* 767. 1939. — *id. id.* Comptes Rend. Soc. Biol. *133.* 234. 1940. — *id. id.* Revue Scient. *78* 106. 1940. — HOPKINS e JAMAMOTO, Arch. o. Derm. a. Siph. *8.* 6119. 1923. — KAPUSZINKI, Zentr. f. Haut. u. Gesl. *18.* 582. — PINETTI, Boll. Soc. Biol. Sper. *22.* 1946. — *id.* Boll. Soc. Biol. Sper. *22.* 1946. — *id.* Scritti in onore di A. Serra. Cagliari. Tip. Edit. Ital. 1947. — VERSARI, Giorn. Ital. Derm. e Sif. *78.* 795. 1937.

Studio clinico-sperimentale dell' allergia

1° Dimostrazione di fattori flogogeni nella cute normale di ammalati di tricofizia granulomatosa

Prof. Franco Flarer — Direttore
Dott. Giuseppe Mezzadra — Aiuto

(Dalla clinica dermosifilopatica dell'Universita, di Padova)

(2. 6. 1947)

Il problema dei rapporti tra immunità, allergia, manifestazioni cliniche specifiche ed aspecifiche è un problema tuttora aperto e notevolmente complesso per la quantità di fattori variabili che vi entrano in giuoco; è in ogni modo un problema che ha aspetti diversi a seconda dei fattori etiologici di modo che, se è ammissibile e probabile che esistano atteggiamenti comuni a tutte le malattie ad andamento allergico immunitario, però non vi ha dubbio che diversità profonde sono riscontrate da malattia a malattia e debbono essere tenute in attenta considerazione.

Il problema specifico delle malattie micosiche a carattere allergizzante offre punti di importanza evidente in riguardo per vari motivi che fanno delle malattie da miceti paradigmi di alto interesse clinico e biologico.

Anzitutto per ciò che riguarda ad esempio le malattie granulomatose immunizzanti da tricofiti ci troviamo di fronte a forme capaci di evolvere nell'ambito di pochi mesi e spontaneamente dallo stato di malattia superficiale a quello di malattia granulomatosa e infine alla condizione immunitaria attraverso una fase allergica, non solo, ma si tratta di malattie nelle quali i fattori tossici che vengono a turbare e complicare notevolmente i problemi in altre forme come nelle malattie tubercolari, giocano un ruolo assolutamente trascurabile; dimodochè la fenomenologia clinica è certamente e tipicamente riconducibile al campo delle manifestazioni allergico-immunitarie dirette.

Dal punto di vista clinico alcuni punti appaiono particolarmente interessanti e non soddisfacentemente risolti nel problema delle tricofizie granulomatose e sono i seguenti:

1. Quali possono essere i fattori determinanti per i quali si passa da una malattia superficiale ad una malattia granulomatosa vera e propria?
2. Quale momento rappresenta l'allergia nella patogenesi delle manifestazioni generalizzate (tricofitidi) che possono con una certa frequenza associarsi alla manifestazione granulomatosa e in particolare ne è la etiolociq specifica o meno?
3. Quale è il reciproco rapporto tra stato allergico e stato immunitario? (essendo noto ed evidente la non necessaria interdipendenza tra queste due condizioni che possono essere subentranti ma anche tra loro non strettamente dipendenti).

Questa prima serie di ricerche che abbiamo eseguite su otto casi di tricofizia profonda a tipo cherion Celsi, si sono rivolte sopratutto a chiarire, analogamente ad acquisizioni già da noi comunicate in altra malattia

allergizzante (lupus eritematoso) la eventuale presenza e significato di fattori filogogeni cutanei in sede extra focolaio.

In verità in questo ordine di malattia tali fattori erano di particolarissimo interesse, perchè, se nelle malattie tubercolari o comunque legate ad allergia tubercolare, l'entrata in giuoco della tubercolina con le sue imponenti capacità tossiche specifiche poteva rendere assai complessa la interpretazione dei fattori flogogeni eventualmente presenti, nel caso di malattia tricofitica un fattore tossico non è dimostrabile e in ogni modo non può certo parlarsi o pensarsi a qualche cosa di paragonabile alla tubercolina.

Come impostazione di ricerca siamo partiti dalle seguenti modalità tecniche:

Asportazione di lembi di cute normale, prelevati a distanza dal focolaio morboso, in tempi differenti riguardo alla evoluzione della malattia, cercando sopratutto di cadere nella fase allergica iniziale e nella fase finale coincidente con la guarigione e con l'instaurarsi di una condizione immunitaria.

Per accertare se eventualmente le differenze di potere flogogeno tra due estratti preparati a tempo diverso fossero legate all' invecchiamento del primo estratto, si fecero controlli nel tempo e usando gli stessi soggetti. Abbiamo così potuto assicurarci che l'invecchiamento non causava modificazioni apprezzabili nella capacità flogogena del liquido preparato come sopra e nel limite di tempo delle esperienze da noi condotte.

La tecnica con la quale dimostravamo il valore quantitativo della sostanza flogogena contenuta nella cute normale del soggetto portatore di granuloma tricofitico in varie fasi era la seguente:

1) Asportazione di un primo lembo di cute normale lontano dal focolaio (per lo più braccio).
2) Asportazione di un secondo lembo di cute a distanza di tempo diversa (da 13 a 51 giorni) nei vari casi.
3) Asportazione di un terzo lembo di cute (caso 8.) a distanza di tempo di 44 giorni dal primo e di 27 giorni dal secondo.

I lembi asportati con la solita tecnica venivano pesati, triturati e pestati con polvere di quarzo (25 mgr. di cute fresca per 1cc. di soluzione fisiologica) indi centrifugati per 10' e tindalizzati un'ora per 3 giorni; si ottenevano così estratti per lo più limpidi. Gli estratti così preparati e provenienti dallo stesso soggetto, venivano iniettati contemporaneamente per via intradermica nella cute del braccio di un certo numero di controlli (in genere 5) alla dose di cc. 0,20.

La lettura delle reazioni ottenute (per lo più di tipo critemato-essudativo) si faceva costantemente dopo 20—24 h, esprimendo l'intensità con una o più crocette.

I risulutati ottenuti sono riassunti nella annessa tabella (inserire la Tav. 1a) nella quale viene segnata sia l'entità dimensionale della reazione tricofitinica del datore del lembo asportato (al momento della asportazione), sia la capacità flogogena degli estratti della sua cute normale saggiata in casi test in numero vario e a capacità reattiva individuale evidentemente diversa ad caso a caso.

Risulta evidente da un primo esame che i risultati di ogni estratto sono sostanzialmente — dal punto di vista della capacità flogogena — uniformi, nel senso che, sebbene i casi test reagiscano con diversa intensità (per esempio i casi di lupus eritematoso presi come controllo dimostrano una volta ancora di essere più sensibili e reattivi anche di fronte

a questo stimolo come già da noi detto e dimostrato in altra sede), però con la tecnica usata di saggiare cioè i due estratti in esame sugli stessi individui contemporaneamente, le differenze relative tra essi, erano sem pre e in ogni caso omologhe e mai si sono avuti risultati contradditori, il che è di grande importanza ai fini della valutazione dei fatti.

E'risultato anche in modo evidente che la tecnica usata serviva perfettamente allo scopo che era appunto quello di confrontare tra loro in modo ineccepibile le capacità flogogene di due estratti prelevati in due momenti differenti da uno stesso datore.

L'analisi particolareggiata dei risultati stessi dà le seguenti cifre di valori medi:

Capacitá flogogena della cute del primo prelievo = 2,24[1])

Capacità flogogena della cute del secondo prelievo = 1,47

E'evidente quindi che in linea generale e valutando la media dei valori, *la quantità di sostanze flogogene presenti nella cute di un individuo portatore di tricofizia granulomatosa dopo un primo incremento tende a diminuire nel tempo.* (Vedi graf. N 1.)

Naturalmente l'interpretazione di questo andamento e cioè di questa diminuzione va fatta tenendo conto sopratutto del momento della malattia nei riguardi sopratutto della sua evoluzione verso la guarigione e lo stato immunitario. Ora in generale noi vedevamo e ci servivamo di casi nei quali la malattia era già nettamente conclamata e stabilita nella sua forma granulomatosa, di modo che in genere possiamo considerare i nostri casi come aventi già superata la prima fase dell'incremento allergico e generalmente avviati verso la fase risolutiva. Naturalmente qualche caso era più iniziale e qualche caso più avanzato e ciò spiega a sufficenza che appunto in qualche caso si è avuto una prima fase di incremento dei fattori flogogeni a cui seguiva una fase di diminuzione corrispondente al miglioramento clinico e quindi all'instaurarsi della fase. immunitaria Queste considerazioni ci permettono quindi di pensare, anche se per ovvie ragioni non è stato possibile seguire i casi con altrettanti prelievi quanti potevano essere necessari a delineare obiettivamente tutto l'andamento del fenomeno, che la produzione di sostanze flogogene si incrementi in un primo tempo della malattia corrispondentemente all'incrementarsi dell'allergia, mentre tende poi a diminuire mano a mano che la forma evolve verso la guarigione con immunità. In effetto abbiamo avuto nei casi (6, 7, 8) i valori che hanno segnato questo preciso andamento. E'evidente che un dato di controllo in questo senso poteva offrircelo la valutazione dello stato patergico dei pazienti e sopratutto una precisa valutazione della fase allergica, però una tale precisazione non si è potuta eseguire in modo completo sopratutto per il fatto che il test tricofitinico di saggio si è dimostrato piuttosto incostante e quindi con valori difficilmente paragonabili tra loro, tuttavia un dato ha potuto essere rilevato ed è quello della intensità dimensionale della reazione tricofitinica nei vari casi e nei vari momenti del prelievo.

I dati sono precisamente i seguenti:

Intensità dimensionale della reazione tricofitinica al momento del primo prelievo = 9,7

Intensità dimensionale al momento del secondo prelievo = 15

Naturalmente si tratta di cifre che si riferiscono alla media dei sin-

---

1) Media riferita ai valori di positività: + + + + = 4, + — — — = 1.

goli valori. Sebbene da esse non sia possibile ricavare con sicurezza il dato della fase pleoergica, omodinamica o pleoestesica che sarebbe necessario determinare per una giusta valutazione dell'evoluzione dello stato allergico dei vari soggetti e nei vari momenti, tuttavia la notevole e costante maggior attività della seconda cifra rispetto alla prima corrisponde in modo assai evidente e suggestivo alla diminuzione della capacità flogogena nei due momenti corrispondenti e dato che come è ovvio e come abbiamo detto i casi erano seguiti più verso il momento della guarigione che verso il momento dell'incremento iniziale, così possiamo anche dal lato della reattività dei singoli datori dedurre quanto già detto ossia che all'incremento iniziale della fase allergica corrisponde con probabiblità l'incremento delle sostanze flogogene presenti nella cute normale mentre alla seconda fase immunitaria si associa una diminuzione. (graf N 2)

I problemi suscitati da queste constatazioni obiettive sono molteplici e si riferiscono sia al problema specifico della malattia granulomatosa tricofitica sia al problema generale delle malattie granulomatose allergizzanti, dato che una constatazione analoga di incremento e diminuzione di sostanze flogogene è stata da noi fatta in altre malattie allergizzanti (tubercolosi) e da parte di Mezzadra sono in corso ricerche analoghe in altra malattia allergizzante (sifilide) con risultati dello stesso tipo.

Interessa auche sapere come in forme evolventi dallo stato allergico allo stato anergico (nelle quali cioè invece che verso la fase immunitaria si va verso la fase anergica) il contenuto di sostanze flogogene aumenta invece di diminuire.

Questa constatazione è stata fatta e controllata a proposito del lupus eritematoso sia in fase anergica definitiva seguita da exitus sia in casi di fase anergica superata nei quali ultimi si è avuto aumento della capacità flogogena nella fase anergica e diminuzione quando superata la fase anergica si è passati di nuovo alla fase allergica (vedi lavoro del Dr. Carli 1947).

Questi dati si ricollegano con la constatazione basilare data da noi fin dal 1940 che la cute del malato pleoestesico (orientato cioè verso la fase anergica) è più flogogena della cute del malato pleoergico (orientato cioè verso la fase immunitaria).

Naturalmente quello che resta di notevole interesse, ma non del tutto chiarito dalle nostre ricerche, è l'intimo significato di interdipendenza reciproca tra sostanze flogogene e allergia, nel senso di stabilire quale sia il primum movens e quali i fattori di reciproco rapporto. Infatti potrebbe essere ammessa una dipendenza del movimento allergico immunitario legato alla formazione delle sostanze flogogene da intendersi come elemento determinante primitivo, ma potrebbe anche in verità trattarsi del vice-versa, ossia potrebbe lo stato allergico scatenare nel contatto continuo e subentrante antigene-anticorpo, la formazione di sostanze flogogene che potrebbero appunto essere legate all'avvenuto contatto di cui sopra.

Il fatto constatabile della diminuzione dell sostanze flogogene in corrispondenza all' accentuarsi della fase immunitaria e viceversa ci pare cosituisca argomento importante per ammettere che le sostanze flogogene rappresentano elemento di diretta derivazione dal focolaio e che il movimento allergico, da esse in parte scatenato, tende evidentemente attraverso alla fase immunitaria ad annullarle.

Naturalmente resterebbe la questione della natura di esse e della loro eventuale specificità.

Ricerche precise in proposito sono in corso ma già dai dati ricavati

nei casi attuali e dai dati delle ricerche precedentemente fatte e citate possiamo trarre alcune deduzioni di un certo interesse.

Anzitutto la questione della specificità sembra risolversi in senso negativo: parlano per la aspecificità molti dati:

1) I caratteri delle manifestazioni provocate dalle stesse sostanze flogogene: manifestazioni intensamente e prevalentemente eritematose anche là dove il quadro morboso della malattia in atto è granulomatoso o comunque infiltrativo (non si verifica cioè il fenomeno dell'isomorfismo reattivo da uno di noi dimostrato in malattie granulomatose specie quando lo stimolo sia di particolare natura).

2) Il fatto che non vi è atteggiamento di specificità reattiva in relazione con la natura della malattia: trattandosi cioè nel caso particolare di malattia tricofitica, se le sostanze flogogene fossero specifiche (riconducibili quindi alla tricofitina) esse dovrebbero dare il maximum di intensità in quei soggetti che fossero specificamente sensibili alla tricofitina e viceversa, ciò che non si verifica nei nostri casi dove l'indice della intensità flogogena agli estratè il seguente:

Lupus eritematoso	1°	prelievo	2,26	—	2° prelievo	2,04
Lupus tubercolare	1°	„	2;1	—	2° „	1,06
Cherion	1°	„	2	—	2° „	1,33

3) Lo stesso fatto si deduce anche dalla constatazione che i soggetti che più risultano sensibili alle sostanze flogogene (lupus eritematoso) non lo sono specificamente in quanto in essi non è la sola tubercolina e nemmeno la tubercolina in modo assoluto a dare le reazioni più specificamente intense.

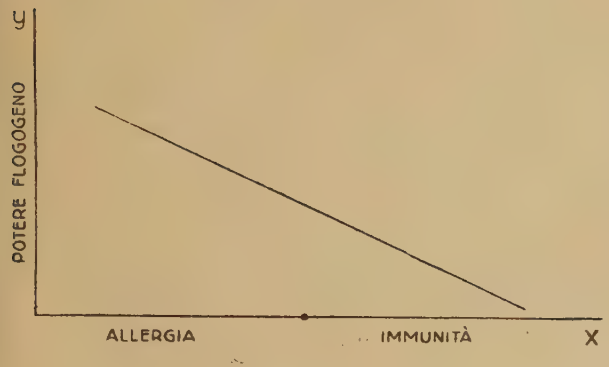


Fig. 1

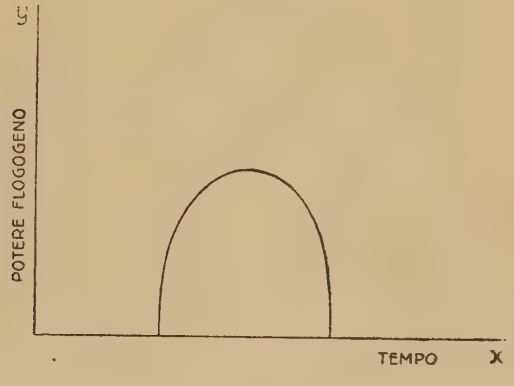


Fig. 2

Così stando le cose è evidente a nostro parere che nello stato allergico il fatto della presenza di sostanze flogogene con lo stesso in rapporto diretto ed evidente, è fenomeno prevalentemente aspecifico e cioè le stesse sostanze flogogene sono generalmente tali all'infuori di ogni specificità rispetto alla causa agente della malattia granulomatosa allergizzante.

Ciò è a nostro parere particolarmente importante in vista della molteplicità dei fenomeni clinici a fisonomia aspecifica che si vedono insorgere

Tav. 1a

Attività

DATORE	Data del prelievo	Fase allergica	1) lupus eritematoso	2) lupus eritematoso
1) C. L.	23-11-1946 6-12-1946	1 m.m. 12 m.m.	+ + + + — — — —	+ + + + + — — —
			1) lupus eritematoso	2) lupus vulgaris
2) C. C.	9-12-1946 9- 1-1947	12 m.m. 16 m.m.	+ + + — + — — —	+ + — — + — — —
			1) kerion	2) lupus eritematoso
3) B. G.	31-12-1946 11- 2-1947	12 m.m. 16 m.m.	+ + + + + — — —	+ + + — + — — —
			1) lupus eritematoso	2) lupus vulgaris
4) C. C.	15-1-1947 5-2-1947	11 m.m. 9 m.m.	+ + + + + + — —	+ + + — + — — —
			1) lupus vulgaris	2) lupus vulgaris
5) V. A.	18-1-1947 8-3-1947	12 m.m. 18 m.m.	+ + — — + — — —	+ + — — + — — —
			1) kerion	2) lupus eritematoso
6) B. A.	23-1-1947 9-2-1947	12 m.m. 12 m.m.	+ — — — + + — —	+ — — — + + + —
			1) kerion	2)
7) A. L.	23-1-1947 9-2-1947	9 m.m. 20 m.m.	+ — — — + — — —	+ — — — + — — —
			1) lupus vulgaris	2) t.b.c. verrucosa
8) A. R.	23-1-1947 9-2-1947 8-3-1947	9 m.m. 20 m.m. 24 m.m.	+ — — — + + + — + — — —	+ — — — + + + — + — — —

flogogena

3) piodemite	4) uretrite gonococcica	5) uretrite gonococcica	6)
+ + + — — — — —	+ + + — — — — —	+ + + + — — — —	
) lupus eritematoso	4) lue III	5) lichen verruc.	6) foruncolosi
+ + + — + — — —	+ + + — + — — —	+ + + — + — — —	+ + + + + — — —
3) lupus vulgaris	4) kerion	5)	6)
+ + + — + — — —	+ + + + + — — —		
3) kerion	4) lupus vulgaris	5) uretrite gonococcica	6)
+ + + — + + — —	+ + + — + — — —	+ — — — + — — —	
3) lupus vulgaris	4) kerion	5) eezemat. pitir.	6)
+ + + — + — — —	+ — — — + — — —	+ + — — + — — —	
3) kerion	4) kerion	5) kerion	6) lupus vulgaris
+ + — — + + — —	— — — — — — — —	+ + — — + + — —	+ + — — + + + —
3)	4) lupus eritematoso	5)	6)
+ + — — + + — —	+ + — — + + + +	+ — — — + — — —	
) lupus eritematoso	4) lupus eritematoso	5) lupus eritematoso	6)
+ — — — + + + — + — — —	— — — — + + + + + — — —	+ — — — + + + — + — — —	

a distanza e in sedi le più svariate in malattie a carattere allergico anche localizzato.

Nel caso particolare riterremmo del massimo interesse porre in analisi sotto questo angolo visuale (del gioco cioè delle sostanze flogogene presenti nella cute del portatore di tricofizia profonda in determinati momenti evolutivi della stessa) la comparsa di manifestazioni cutanee eritematose diffuse a carattere genericamente infiammatorio che sono definite appunto come tricofitidi. I rapporti di esse con una diffusione ematica dell'agente morboso, sic et simpliciter, sono assai discutibili e nello stesso ordine di fatti d'altro canto stanno altre manifestazioni esantematiche complicanti malattie granulomatose allergizzanti assai poco chiare nella loro precisa patogenesi.

In altri termini dopo la dimostrazione evidente ed indiscutibile della formazione di sostanze flogogene in cute apparentemente normale di soggetti affetti da malattia allergizzante localizzata, si apre sotto nuova luce il problema delle manifestazioni eritemato-infiammatorie cutanee complicanti in determinati momenti tali quadri: tutte contraddistinte dalla constatazione della sostanziale aspecificità di struttura, dalla loro particolare labilità e dalla assenza genericamente granulomatosa del loro substrato.

Autoriassunto

Gli A. A. studiano il potere flogogeno di estratti di cute provenienti da 8 casi di tricofizia profonda. Gli estratti preparati con lembi di cute asportati dallo stesso soggetto in tempi diversi rispetto al decorso della malattia ed iniettati contemporaneamente in controlli hanno dimostrato un potere flogogeno diverso. Le sostanze flogogene dopo una fase di incremento diminuiscono descrivendo in complesso una curva parabolica.

Tale diminuzione procedendo parallelamente all'accentuarsi della fase immunitaria permette agli A. A. di concludere che le sostanze flogogene rappresentano elementi di diretta derivazione del focolaio e che il movimento allergico in parte da esse scatenato tende ad annullarle attraverso alla fase immunitaria.

Summary

A clinic and experimental study on allergy. I) Demonstration of phlogogenic factors in the normal skin of people affected with granulomatous trichophytosis.

The AA. study the phlogenic action of skin extracts from 8 cases of deep trychophytosis. The extracts prepared by means of skin sheets taken away from the same subject at different times of the course of the disease and simultaneously injected into test organisms, have shown a different phlogogenic power. After an increasing period, the phlogogenic substances decrease, thus drawing a parabolic curve. Such decrease, going along parallelly with the stressing of the immunity stage, led the AA. to the conclusion that the phlogogenic substances represent elements of direct focal origin; and that the allergic movement by them, at least partially, excited, is aimed to their annulment through the immunity stage.

Bibliografia

FLARER F. e MEZZADRA G. Archivio Ital. Med. Sperimentale. Note 1—4°. 1940.
CARLI G. Archivio Ital. Derm. e Sifilg. 1948.

Chiavi analitiche dei lieviti segnalati nelle uve, nei mosti e nei vini

R. CIFERRI
(Istituto Botanico e Laboratorio Crittogamico dell'Università di Pavia)

O. VERONA
(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della Università di Firenze)

(11—11—1947)

Nonostante l'argomento non sia strettamente pertinente alle materia usualmente trattata in questa Rivista, crediamo utile riprodurre le seguenti chiavi analitiche relative ai lieviti segnalati presenti nelle uve, nei mosti e nei vini, e già in precedenza inserité in un'opera tecnica [1]).

Con l'occasione le stesse chiavi sono state aggiornate e completate.

1. A) — Colonie (in gelatina o in agar) a margini lisci
   a) — Generalmente bianche (o color crema o brunastre con il tempo) 2
   b) — Generalmente rossastre o rosse per pigmento carotinoide *Rhodotorula*

   B) — Colonie a margini più o meno evidentemente filamentosi o anche lisci. In quest'ultimo caso cellule ogivali o globose, aggregate o in corte catene, di lenta crescita, di scarsa vitalità, oppure rotonde e miste a grosse cellule provviste di goccia oleosa . . *Brettanomyces-Candida*

2. A) — Fermenta il mosto (glucosio) 3
   B) — Non fermenta il mosto (glucosio) 9

3. A) — Forma un denso velo a fermentazione terminata; generalmente la coltura emana odore di etere acetico . . . *Hansenula*
   B) — Non forma velo (o solo in tracce, incompleto e sottile) oppure il velo si ha anche avanti l'inizio della fermentazione; colture di solito senza particolare odore etereo 4

4. A) — Moltiplicazione vegetativa per scissione: *Schizosaccharomyces*
   B) — Moltiplicazione vegetativa per gemmazione:
      a) — Cellule mai citriformi (apiculate) 5
      b) — Cellule più o meno evidentemente apiculate . . . 7

5. Cellule globose, ovate, ellittiche, talvolta con goccia oleosa
   A) — Formanti spore 6
   B) — Non formanti spore
      a) — Colonie bianche o di colore crema o carnicino *Torulopsis*
      b) — Colonie rosse o rossastre per pigmento carotinoide . . *Rhodotorula*

[1]) in: P. G. GAROGLIO — Trattato di Enologia, v. II, 1941.

6. A) — Ascogenesi partenogenetica; cellule globose od ovali od ellittiche . . . . . *Saccharomyces*
   B) — Tentativi di copula nella formazione dell'asco; cellule normalmente provviste di goccia oleosa . . . . *Torulaspora*
   C) — Ascogenesi iso- od eterogamica; cellule come in A)
      a) — Fermentazione di solito assai attiva; osmofilia accentuata, 1—4 spore per asco a parete liscia . *Zygosaccharomyces*
      b) — Specie non sempre fermentanti, spesso formanti velo; ascogenesi di solito eterogamica; spore in genere una per asco a parete verrucosa . . . . . *Debaryomyces*

7. A) — Cellule generalmente e tipicamente apiculate . . . 8
   C) — Cellule non tipicamente apiculate . . *Saccharomycodes*

8. A) — Formanti spore . . . . . *Kloeckeraspora*
   B) — Non formanti spore . . . . . *Kloeckera*

9. A) — Formanti spore 10
   B) — Non formanti spore 11

10. A) — Cellule di solito allungate e aggregate; spore 1—4, emiediriche, angolose o irregolari. Velo nei mezzi liquidi . . *Pichia*
    B) — Cellule piccole, globose od ovoidi, di solito isolate; 1 spora per asco . . . . . *Debaryomyces*

11. A) — Cellule generalmente allungate e aggregate. Velo nei mezzi liquidi . . . . . *Mycokluyveria* (Mycoderma)
    B) — Cellule generalmente globose od ovali. Non velo . . . . . *Torulopsis*

La presente chiave analitica é stata redatta sulla base delle segnalazioni dei lieviti, ascosporei ed anascosporei, trovati su uve, vini, mosti in fermentazione e concentrati, filtrati dolci, ecc. limitatamente alla specie, varietà e forme (incluse le razze morfologiche) sufficientemente note si da essere riconoscibili. Sono state quindi tralasciate la maggior parte delle segnalazioni incerte, o delle specie incompletamente studiate, o irriconoscibili, particolarmente quelle figuranti nella letteratura zimologica anteriore al 1910. Così pure non sono incluse nelle chiavi analitiche le razze ed i „ceppi" distinti esclusivamente per caratteri biologici diversi da quelli impiegati per la diagnosi differenziale dei lieviti e, in generale, tutte le razze costituenti i ceppi locali di fermentazione, distinti con i nomi dei vitigni o di vini dai quali si sono ricavati.

Saccharomyces

I) Fermenta glucosio (1), galattosio e maltosio *S. italicus* Castelli.
II) Fermenta glucosio, saccarosio e raffinosio *S. Chevalieri* var. *torulosus* (Osterw.) Stelling Dekker (= *S. torulosus* Osterwalder).
III) Fermenta glucosio, galattosio, maltosio e saccarosio *S. Chodati* Steiner.
IV) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio e raffinosio.
   A) Cellule gemmanti minori (3—4 × 4—6 μ); aschi sempre 2-spori *S. exiguus* (Reess) Hansen.

[1]) Sempreché non sia espresso altrimenti s'intende che la fermentazione del glucosio comporta anche quella del levulosio e del mannosio.

AA) Cellule gemmanti maggiori (5 × 8 — 12 μ); aschi 1—4 spori.
B) Aschi sempre 4-spori *S. tetrasporus* Beijerinck (= *S. Mangini* var. *tetrasporus* Dekk.)
BB) Aschi 1—4-spori *S. tetrasporus* var. *Mangini* (Guill.) Ciferri et Verona (= *S. Mangini* Guilliermond).

V) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosio.
A) Cellule gemmanti allungate (2—6 × 8—19 μ) *S. Bayanus* Saccardo.
AA) Cellule gemmanti ovate od ellittiche (3—7 × 5—10 μ).
B) Aschi 1—4-spori; non assimila i nitrati *S. oviformis* Osterwalder
BB) Aschi sempre 2-spori; assimila i nitrati *S. oviformis* var. *bisporus* Castelli.

VI) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosio (1/3) *S. cerevisiae* Hansen.
A) Colonie grigiastro-giallognole *S. cerevisiae* var. *festinans* (Ward et Bak.) Stelling Dekker (= *S. festivans* Ward et Baker).
AA) Colonie bianche.
B) Cellule gemmanti maggiori (6—9 × 8—13 μ sino ad 8—10 × 15—18 μ) *S. cerevisiae* var. *major* (Cast.) Ciferri et Verona (= *S. ellipsoideus* var. *major* Castelli).
BB) Cellule gemmanti minori (generalmente 3—6 × 6—11 μ).
C) Aschi 1—4-spori *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hans.) Stelling Dekker (= *S. ellipsoideus* Hansen).
CC) Aschi 1—2-spori *S. cerevisiae* var. *umbra* Castelli.

VII) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosio (interamente).
A) Cellule ovato-allungate, in serie a forma di salsiccia *S. Pastorianus* Hansen.
AA) Cellule ovate, ellittiche od allungate, isolate od in brevi catene di pochissimi elementi.
B) Cellule gemmanti ovate (3—5 × 7—10 μ) *S. carlsbergensis* var. *valdensis* (Osterw.) Stelling Dekker (= *S. valdensis* (Osterwalder) e *S. carlsbergensis* var. *mandshuricus* I e II (Saito) Stelling Dekker (= *S. Mandshuricus* Saito) non differenziabili morfologicamente tra di loro.
BB) Cellule gemmanti ovali sino ad allungate e filiformi, 3—6 × 7—15 μ (sino a 2—5 × 4.5—20 μ) *S. uvarum* Beijerinck.

VIII) Fermenta glucosio, saccarosio, maltosio, lattosio e raffinosio *S. apulicus* Ciferri et Verona (= *Saccharomyces* sp. Mezzadroli).

Saccharomycodes

Una sola specie: *S. Ludwigh* Hansen.

Schizosaccharomyces

I) Fermenta glucosio e maltosio, aschi 8-spori *S. octosporus* Beijerinck.
II) Fermenta glucosio, saccarosio e maltosio; aschi 4-spori *S. Pombe* Lindner (= *S. liquefaciens* Ostw.).

Zygosaccharomyces

I) Senza potere fermentativo.
A) Colture non mucose; copulazione eterogama o partenogenetica; cellule non aggregate; assimila poco bene i nitrati; non fluidi-

fica la gelatina *Z. picenus* Ciferri et Verona (= *Zygosaccharomyces* sp. Ver. et Luch.).

AA) Colture mucose; copulazione eterogamica od isogamica; cellule generalmente aggregate; assimila bene i nitrati; fluidifica la gelatina *Z. conglomeratus* (Reess) Ciferri et Verona (= *Saccharomyces conglomeratus* Reess).

II) Fermenta glucosio, saccarosio e raffinosio.

A) Cellule gemmanti ovate od ellittiche, oppure molto allungate; copulazione isogama o partenogenesi *Z. vini* Naganisha.

AA) Cellule gemmanti sferiche, oppure molto allungate; copulazione eterogama o partenogenesi; *Z. globiformis* Kroemer et Krumbholz.

III) Fermenta glucosio e maltosio.

A) Cellule gemmanti di forma variabile; copulazione isogama o partenogenesi; aschi 1—3-spori, *Z. polimorphus* Kroemer et Krumbholz.

AA) Cellule gemmanti ovate od ellittiche o del tipo *Pasteurianus;* copulazione generalmente isogama, ma ancha eterogama o partenogenesi; aschi 2—3-spori, *Z. polymorphus var. variabilis* Kroemer et Krumbholz.

AAA) Cellule gemmanti solo ovate od ellittiche; copulazione isogama od eterogama; aschi 2—4-sporei *Z. polymorphus var. ameboideus* (Kr. et Kr.) Ciferri et Verona (= *Z. ameboideus* Kroemer et Krumbholz).

IV) Fermenta glucosio, saccarosio e maltosio *Z. felsineus* Sacch.

V) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio e maltosio.

A) Fermenta poco il galattosio *Z. gracilis* Kroemer et Krumbholz.

AA) Fermenta bene il galattosio *Z. gracilis* Kr. et Kr. var. *italicus* Sacchetti.

VI) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio e raffinosio *Z. Marxianus* (Hans.) Guilliermond et Negroni (= *Saccharomyces Marxianus* Hansen).

VII) Fermenta glucosio, galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosio.

A) Non assimila i nitrati; cellule ovate sino ad allungate; copulazione isogama o partenogenesi. *Z. Priorianus* Kloecker.

AA) Assimila i nitrati; cellule sferiche; copulazione eterogama o partenogenesi *Z. florentinus* Castelli.

Torulaspora

Una sola specie: *T. Rosei* Guilliermond.

Hansenula

A) Cellule poliforme; fermenta poco galattosio e maltosio (oltre a glucosio, saccarosio e raffinosio); aschi 2-4-spore *H. anomala* (Hans.) Sydow (= *Saccharomyces anomalus* Hansen; *Willia anomala* Hansen).

AA) Cellule arrotondate o ovate-allungate; fermenta bene galattosio e maltosio (oltre agli altri carboidrati); aschi 1-4-spore *H. anomala* var. *sphaerica* (Naeg.) Stelling Dekker (= *Saccharomyces sphaericus* Naeg.; *S. acetaethylicus* Beijerinck).

Pichia

I) Fermenta glucosio (e levulosio) *P. uvarum* Verona et Luchetti.

II) Manca di potere fermentativo.
A) Assimila i nitrati.
B) Assimila bene i nitrati; scarso sviluppo in presenza di alcool etilico; aschi 1-2-spori *P. Derossii* Castelli.
BB) Assimila poco i nitrati; sviluppa bene in presenza di alcool etilico; aschi tipicamente 2-spori. *P. chiantigiana* Castelli.
AA) Non assimila i nitrati.
B) Fluidifica la gelatina; spore a cappello *P. Chodati* var. *Trumpyi*. (Zender) Stelling Dekker (= *Endomyces Trumpyi* Zender; *Willia Trumpyi* Guilliermond).
BB) Non fluidifica la gelatina; spore angolose o rotonde.
C) In soluzioni alcoliche forma isolotti di velo; 1—4 ascospore; scarsa azione acidificante *P. membranaefaciens* Hansen.
CC) C.s.; aschi sempre 1—2-sporei; forte azione acidificante *P. membranaefaciens* Hansen var. *acidificans* Scrivani.
CCC) In soluzioni alcoliche forma un velo intero rugoso. *P. alcoholophila* Kloecker.

Kloeckeraspora

Una sola specie: *K. uvarum* Niehaus.

Rhodotorula

Una sola specie: *Rh. glutinis* (Fres.) Harrison (= *Cryptococcus glutinis* Fresenius; *Saccharomyces glutinis* Cohn; *Torula glutinis* Pringsheim et Bilewsky).

Torulopsis

I) Manca di potere fermentativo.
A) Colonie a pigmento carnicino: *T. carnescens* Verona et Luchetti
AA) Colonie prive di pigmento (bianche).
B) Assimila i nitrati; cellule rotonde o obovate: *T. albida* (Saito) Lodder.
BB) Non assimila i nitrati; cellule ovali od ellittiche; *T. uvae* (Poll. et Nann.) Lodder (= *Cryptococcus uvae* („uveae") Pollacci e Nannizzi).
II) Aventi potere fermentativo.
A) Fermenta glucosio e raffinosio: *T. bacillaris* (Kr. et Kr.) Lodder (= *Saccharomyces bacillaris* Kroemer et Krumbholz).
AA) Fermenta glucosio, saccarosio e raffinosio: *T. stellata* (Kr. et Kr.) Lodder (= *Saccharomyces stellatus* Kroemer et Krumbholz).

Kloeckera

A) Cellule gemmanti di μ 1. 5—3. 5 × 4. 5—9: *K. apiculata* (Reess emend. Kloecker) Janke (= *Saccharomyces apicultus* Reess; *Pseudosaccharomyces apiculatus* Kloecker; *Hansenia apiculata* Lindner).
AA) Cellule gemmanti maggiori che nella *K. apiculata* (μ 3. 5—6 × 5. 5—10) *K. magna* (de Rossi) Janke (= *Pseudosaccharomyces magnus* de Rossi)
AAA) Cellule gemmanti minori che in *K. apiculata* (2. 5 × 3. 5—9): *K. brevis* Lodder.

Mycokluyveria
(ex Mycoderma)

I) Colture lisce su mezzi solidi.
- A) Non forma velo in soluzioni nutritive alcoolizzate. *M. vini* (Desmazières) Ciferri et Redaelli.
- AA) Forma velo in soluzioni nutritive alcoolizzate.
  - B) Azione intensamente acidificante sui vini; cellule minori (3—7 × 2—3 μ) *M. acidificans* (de Rossi) Ciferri et Redaelli.
  - BB) Azione scarsamente acidificante o diminuente l'acidità; cellule di solito più lunghe.
    - C) Cellule larghe 3—5, 4 μ; habitat preferenziale la birra *M. cerevisiae* (Desmazières) Ciferri et Redaelli.
    - CC) Cellule ovate sino a sferiche; non modifica l'acidità totale del vino: *M. duplex* (de Rossi) Ciferri et Redaelli (incluso la var. *degradans* Scrivani).
    - CCC) Cellule ellittiche od allungate sino a cilindriche; diminuisce l'acidità totale del vino *M. tenax* (de Rossi) Ciferri et Redaelli.

II) Colture rugose su mezzi solidi.
- A) Cellule corte; nelle colture giovani non oltre 8 μ *M. Lafari* Jancke.
- AA) Molte cellule lunghe 8 μ.
  - B) Cellule talora ricurvate; velo in soluzioni alcolizzate *M. decolorans* Will.
  - BB) Cellule sempre diritte; non forma velo c.s. *M. valida* Leberle.

Candida

Una sola specie: *Candida pulcherrima* (Lindner) Wind.

Brettanomyces

- A) Fermenta glucosio, saccarosio e maltosio; cellule ogivali o in corte catene o miste ed aggregate a pseudomicelio dando quadri tipo *Candida o Mycotorula: B. bruxellensis* Kuff, et v. Laer *(Mycotorula intermedia* Krumbholz et Tauschanoff; *Mycotorula vini* Verona et Luchetti).
- AA) Fermenta glucosio e saccarosio; cellule globose in corte catene o in aggregati cellulari: *B. italicus* Verona et Florenzano.

Riassunto

A scopo di primo riferimento, si dà una chiave analitica sommaria e preliminare di tutti i lieviti rinvenuti presenti nelle uve, nei mosti e nei vini.

Sumario

Con el fin de una primera referencia, exponese una clave analitica, sumaria y preliminar, de todas las levaduras contenidas en las uvas, en los mostos y en los vinos.

Summary

With the purpose of a first reference, an analytical, concise and preliminar key of all the yeasts found on grapes, musts and wines, has been sketched.

Résumé

Dans le propos de donner une première référence, on expose une clef analytique, abregée et préliminaire, de tous les levûres trouvées dans les raisins, dans les moûts et dans les vins.

Segnalazione e descrizione di lieviti nelle „acque di vegetazione" delle olive [1]

R. CIFERRI
(Direttore Istituto Botanico e Laboratorio Crittogamico Università di Pavia

O. VERONA
(Direttore Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università di Firenze)

F. LUPARINI
(Allievo interno, Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università di Perugia)

Comunicazione del Centro di Micopatologia umana e comparata, Università di Pavia e Milano)

(con 1 tavola)
(15. 6. 1947)

Forse il solo sottoprodotto dell'oleificio sino ad oggi non utilizzato, è la cosidetta „acqua di vegetazione", cioè l'acqua contenuta nelle olive che, durante l'estrazione dell'olio, si separa dall'olio stesso, sia per gravità che per centrifugazione. Uno di noi (LUPARINI, 1939) ha passato in rassegna le proposte di utilizzazione di tale acqua di vegetazione, che fondamentalmente si riportano:

1) ad approfittare del contenuto in sali minerali, sia per concimare i suoli agrari che per estrarne la potassa;

2) ad approfittare del contenuto in zuccheri fermentescibili (in media 3 per cento), col lasciarla soggiacere alla fermentazione alcolica — naturale o migliorata — per la produzione di alcole etilico.

Una serie di saggi effettuati nell'Umbria da uno di noi (LUPARINI, 1939) tra il 1937 e il 1939, portò a concludere sulla relativa frequenza dei lieviti nelle suddette acque (2).

Identificati provvisoriamente nel lavoro del 1939, furono ulteriormente studiati dai due Autori „seniores", ed è sulla loro identità che viene riferito in questa Nota.

1) **Ceppo no 5.** Torulopsis Holmi (Joerg.) Lodder.

Isolate 16 volte (frequenza circa 17 %). Produzione media di alcole etilico in peso 4—4,5 %: massimo 4,56 %.

Cellule che nelle giovani colture su mosto e su malto si presentano isolate o qualche volta riunite in gruppetti di 2—4, di forma globosa o rotondeggiante delle dimensioni medie di 3,6—4 μ. Nelle colture su mosto e su malto si ha dapprima intorbidimento e scarsa fermentazione, indi deposito abbondante e grigiastro. Negli strisci su agar, come nella colonia gigante, si hanno patine cerose, bianche, lucide, liscie o scarsamente corrugate.

Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio, galattosio. Non fermenta il maltosio e il lattosio. Non liquefa la gelatina. Caratteri identici a quelli descritti in LODDER (1934).

2) **Ceppo no 10.** Probabilmente identico al ceppo tipo no 13 sotto descritto, salvo il fatto che non si è potuto osservare la coniugazione delle cellule. Isolato 14 volte

---

1) Questo lavoro vede la luce con un ritardo di circa otto anni, per le difficoltà inerenti lo stato di guerra. A causa delle stesse ragioni, le collezioni dei lieviti isolati e studiati è andata perduta; ma data la frequenza e la relativa loro costanza nel substrato d'isolamento, non dovrebbe essere difficile reisolarli, se desiderato.

2) Furono isolati anche 26 ceppi batterici che non si indagarono ulteriormente.

(frequenza circa 10 %). Produzione media di alcole etilico in peso 0,1 %; massimo 0,12 %.

3) **Ceppo no 13.** Trichosporon fermentans Didd. et Lodd.

Isolato 20 volte (frequenza circa 15 %). Produzione media di alcool etilico 1,6 % in peso; massimo 2,01 %.

Questa specie, provvisoriamente identificata da uno di noi (LUPARINI, 1939) come **Trichosporon** sp., presenta cellule che nelle giovani colture su mosto e su malto cilindrico-allungate, isolate o riunite in ammassi di pochi indvidui: con le formazioni miceliari si osservano blastospore ed artrospore.

Nelle colture su mosto e su malto si ha subito formazione di spessa membrana superficiale biancastra e un leggero intorbidamento del liquido sottostante. Negli strisci su agar come nelle colonie giganti si hanno vegetazioni lanose, abbondanti, di color bianco-grigiastro.

Fermenta glucosio, levulosio, mannosio e molto scarsamente galattosio. Questo interessante ceppo costituisce, per quanto ci è noto, il primo reisolamento del livieto indicato come **Geotrichoides** sp. ceppo 117 da RENNERFERT, che lo isoló da pasta di legno in Svezia [3]).

I caratteri morfologici sono tali da far rientrara la specie, non c'è dubbio, entro **Trichosporon**; tuttavia, possedendo — unica nel genere — attività fermentativa, potrebbe sorgere l'opportunità di tenerla distinta in nuovo genere.

4) **Ceppo no 13.** Zygosaccharomyces mongolicus Saito.

Isolato una sola volta, in un ceppo sporificante (vedi pure al no 2). Produzione media di alcole etilico 0,30 %; massimo 0,37 % in volume. Fu preventivamente descritto da uno di noi LUPARINI, 1933) come **Z. Nadsoni** Guill. con le seguenti caratteristiche: „Cellule che nelle giovani colture si presentano rotondeggianti, spessissimo isolate, qualche volta riunite in gruppi di 3 —4 individui delle dimensioni medie di 2,5—3,5 μ. Nelle colture liquide, su mosto e su malto, si nota dapprima forte intorbidimento, indi formazione di deposito biancastro. Scarsa fermentazione. Negli strisci su agar come nelle colonie giganti, si ha formazione di patine abbondanti bianco-grigie, secche, grinzose. La sporificazione si ha rapidamente su tutti i substrati. La formazione degli aschi avviene sia per fatti di copulazione eterogamica, sia per partenogenesi. Gli aschi, rotondi od ovali, contengono generalmente 2—3 spore raramente una sola, rotonde, a parete liscia, delle dimensioni di $\pm$ 1—1,5 μ.

Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio ; non fermenta il saccarosio, maltosio e lattosio. Non liquefa la gelatina".

In realtà le differenze sono notevoli, la più importante essendo quella delle dimensione medie delle ascospore, nel nostro ceppo di 1—1,5 μ di diametro, e nel **Z. Nadsoni** di circa 2,7 μ di diam.

Dato l'interesse che offriva, se ne fece uno studio più dettagliato, riportandone le caratteristiche anche in colture sotto uno strato di olio di oliva, e, per comparazione, sotto olio di vaselina.

Patina su agar fagiuoli al 7° giorno. In superficie vegetazione bianco-lattea. La patina si approfondisce più o meno nel substrato, ma a volte singolarmente, e vi si formano filamenti. Il reperto microscopico indica presenza di pseudoife vacuolate contenenti numerose goccioline di grasso misuranti (3,5—4) $\times$ (17,7—25) μ, miste a cellule rotonde di 6,8—7,4 μ di diametro, con vacuoli. Nella vegetazione dentro il substrato abbondano cellule in via di coniugazione, spesso provviste di un prolungamento. Si osservano rari aschi, con 1, più spesso 2—4 spore, subovali o rotonde, di 2,2 μ circa di diametro. **Su malto, al 3° giorno,** in superficie anello, non pellicola. Liquido torbido e fioccoso con abbondantissimo deposito. Sviluppo di gas. Cellule attivamente gemmanti, rotonde o subrotonde, vacuolate, con gocce di grasso. Al 15° giorno anello alto, con tentativi di formazione di sottile velo. Al fondo deposito singolarmente abbondante. In superficie scarseggiano le cellule rotonde per esclusiva prevalenza

[3]) Reperto, probabilmente non pubblicato se non nella trattazione di Diddens e Lodder.

di cellule allungate, di (3,5—4,1) × (17—24) μ, riunite a costituire lunghe pseudoife.

Col. gigante su agar-fagiuoli al 15° giorno. Bianca, circolare, poltacea, di cm. 1,5 circa, piatta al centro, con leggero rilievo a capezzolo e con i margini lobato-frangiati.

Idem su agar malto al 15° giorno. Bianca, circolare, pastosa-cerosa, opaca, al centro piatta e con orli degradanti, lobati e leggermente incisi radialmente. In ogni caso cellule, in maggioranza, in coniugazione.

Patina colturale su agar fagiuoli sotto olio oliva al 7° giorno. Sviluppo considerevole di patina avente i caratteri di quella normale; orlo però non frangiato; non approfondimento nel substrato. Cellule rotonde o subovali, senza filamenti di 6, 8—7,9 μ circa, con vacuolo.

Idem sotto olio di vaselina al 7° giorno. Patina come sopra. Cellule anche come sopra ma più eterometriche: i diametri oscillano tra 4,2 e 7,9 μ. Costantemente provviste di un grande vacuolo.

Su fette di patata al 15° giorno. Sviluppo quasi nullo.

Id. sotto olio d'oliva. Sviluppo quasi nullo.

Su fette di carota al 15° giorno. Patina relativamente abbondante, bianca, lucente, rilevata, poltacea, ad orlo leggermente lobato. Cellule rotonde od ovali; vacuolate o granulose, di 5,3—7,1 μ, in media di 5 μ.

Id. ma sotto olio d'oliva. Sviluppo scarso. Cellule come sopra, con presenza di vari elementi piuttosto ovali di 6,2—8,8 μ Rari aschi partenogenetici, contenenti 1—2 spore rotonde e lisce, di 1—1,5 μ diam.

Caratteri fisiologici

Tutte le colture sono state effettuate a temperatura ambiente di laboratorio (20° C circa).

Fermentazioni

	ac.	gas
Glucosio	+	+
Levulosio	+	+
Mannosio	+	+
Galattosio	+	+
Saccarosio	+ (poco)	+
Maltosio	—	—
Raffinosio	+ (poco)	—
Lattosio	—	—

Assimilazione degli zuccheri (in acqua di lievito più:)

+
+
+
+
+
+
+
—

Assimilazione delle sostanze azotate

in acqua di lievito più	in soluzione nutritizia minerale e glucosio
peptone +	++
aspar. —	±
urea +	—
nitrato K—	—
solfato ammonico —	—

assimilazione acidi grassi

ac. stearico ?
ac. oleico +
ac. margarico —
palmitina —
stearina —

Per i caratteri colturali e per quelli biochimici, coincide bene con lo **Zygosaccharomyces mongolicus** Saito, ma se ne differenza per la micromorfologia cellulare, in quanto la nostra specie forma delle pseudoife, spesso molto lunghe e dense nella vegetazione superficiale, assieme alle cellule gemmanti ordinarie, mentre lo **Z. mongolicus** mostra solo queste ultime. Per il biochimismo è notevole che differisca dallo **Z. mongolicus** per fermentare, oltrechè glucosio, levulosio, mannosio e galattosio, anche saccarosio e raffinosio, caratteri non indicati da SAITO, ma che sono stati riscontrati — sia pure non evidentemente — dalla STELLING—DEKKER.

Tutto sommato, le differenze da noi riscontrate non ci sembrano tali comunque da poter distinguere sistematicamente il nostro ceppo dal tipo dello **Z. mongolicus.** L'evidente filamentosità del nostro ceppo può essere messa in rapporto ad un qualche stato di fase.

5) **Ceppo N. 14 R.**— Torulopsis Holmi (Joerg.) Lodd. (vedi pure al n. 1).

Isolato 17 volte (13 % circa di frequenza). Produzione massima di alcole in volume 7,24 %.

In precedenza descritto con le seguenti caratteristiche :

„Cellule che nelle giovani colture su mosto e su malto si presentano globose, riunite in gruppi formati da numerosi individui, delle dimensioni medie di 3,6—4,2 μ. Nelle colture su mosto e sul malto si ha dapprima un lieve intorbidamento e scarsa produzione di gas : in seguito forte intorbidamento, che rimane anche nelle colture molto vecchie. Nelle colture per striscio, come nelle colonie giganti, si ha formazione di patine grigio-rossiccie, mucose. Fermenta il glucosio, levulosio, mamosio, accarosio, galattosio. Non fermenta il lattosio e il maltosio. Non liquefà la gelatina."

Riteniamo che questi ceppi sieno delle varienti della tipica **T. Holmi** Joerg. (vedi al n. 1), differendo per il colore delle colonie e delle patine vecchie (grigio-rossiccie e non bianche), mucose e non cerose, e per avere una maggiore attività fermentativa sul glucosio. Le caratteristiche differenziali non sono tali da distinguere sistematicamente questi ceppi del tipo.

6) **Ceppo N. 59.** Saccharomyces Rouxi Boutr. Isolato 20 volte (15 % circa di frequenza). Produzione massima di alcole etilico 7,90 % in peso.

Le caratteristiche a suo tempo indicate da uno di noi (LUPARINI, 1939) furono le seguenti : „Cellule che nelle giovani colture su mosto e su malto si presentano isolate o riunite a paia, di forma globosa o ellittica, delle dimensioni medie di 3,2—3,6 = 4—4,5 μ. Nelle colture su mosto e su malto si ha dapprima intorbidimento e fermentazione attiva ; successivamente deposito di colore biancastro, abbondante. Nelle colture per striscio, come nelle colonie giganti, si ha sviluppo di patine di color bianco grigio, lisce o leggermente corrugate. La sporificazione avviene molto rapidamente nel gesso, più lentamente negli altri substrati. Gli aschi, partenogenetici, contengono da 1 a 3 spore rotonde a parete liscia, delle dimensioni di 2 μ circa.

Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio, maltosio, galattosio. Non fermenta il saccarosio e il lattosio. Non liquefà la gelatina."

Nel citato lavoro erano anche indicate le ragioni per le quali si è cercato reidentificare questa vecchia e negletta specie, descritta da L. BOUTROUX (Bull. Soc. Linn. Normandie, VII, 1883. Ann. Sc. Nat., Bot., **17**, 144—209, 1884) e da lui reidentificata come una specie trovata da E. ROUX (Bull. Soc. Chim., **35**, 371) su glucosio deteriorato. BOUTROUX l'avrebbe reisolata più volte da sciroppi, dolci e glucosio solido, differenziandola dalle specie allora note per la capacità di fermentazione del glucosio, ma non del saccarosio. Come sempre, la reidentificazione di ceppi oggi studiati con vecchie specie descritte nella letteratura è resa difficile dalla incompletezza dei dati diagnostici e da possibili differenze d'interpretazione di dati morfologici. Per questa specie, il punto più controvertibile è la produzione di ascospore in vecchie cellule di velo del liquido (cfr. la fig. 41 [nel testo a pag. 126 indicata come **K** 1] della tav. 16), che è possibile, ma che noi non abbiamo osservata. E probabile che BOUTROUX abbia scambiato delle inclusioni lipidiche per spore. Comunque, preferiamo riesumare un vecchio nome specifico, emandandone le descrizione, piuttosto che creare un nuovo binomio.

7) **Ceppo tipo N. 57.** Hansenula Castellii nob., n. sp. [1])

Isolato 16 volte (frequenza circa 11 %). Produzione massima di alcole etilico in peso 7,18 %.

Le caratteristiche a suo tempo indicate sono state le seguenti : „Cellule che nelle giovani colture su mosto e su malto si presentano ellittiche, globose, allungate, quasi sempre isolate o riunite in gruppi di numerosi individui, delle dimensioni medie di 2,4—3,6=4—4,5 μ. Nelle colture su mosto e su malto si ha dapprima intorbidamento e

---

[1]) **Hansenula Castellii nob., n. sp.** In musto et malto, sedimentum et velum efformans. Cultura in agaro musto uvarum et agaro malto, nec in coloniis giganteis, albogriseola, levia parum evoluta. Cellulis globosis, ellipticis vel leviter elongatis, 2, 4—3,6, X4—4, 5 μ singulis vel aggregatis. Ascis (in gypso et in agaro generatis) ellipticis, pro more 2-sporis, rarius 1-sporis; ascosporis hemisphaericis, 1—1,2 μ diam. Fermentatio dextrosi (laevulosi, mannosi), galactosi et maltosi. Gelatina numquam liquata.

Hab. in „aqua vegetationis" olivarum confectarum, Perusiae (Italia media)."

Specie dedicata al Prof. T. CASTELLI, studioso dei lieviti italiani.

fermentazione attiva, indi formazione di velo superficiale, risaliente lungo le pareti del tubo, e leggero deposito. Negli strisci su agar, come nelle colonie giganti, si ha formazione di patina liscia, bianco-grigiastra, ma non molto abbondante. La sporificazione è rapida sul gesso, meno rapida sugli altri substrati. Gli aschi, di forma più o meno ellittica, contengono generalmente due spore, raramente una, emisferiche, a forma di capello, delle dimensioni di ± 1—1,2 μ.

Fermenta attivamente glucosio, levulosio, mannosio, maltosio, galattosio. Non fermenta il saccarosio e il lattosio. Non liquefà la gelatina."

Questo ceppo si perdette avanti che si fosse potuto ristudiare a fondo, ma le caratteristiche fermentative — come già si indicava nel citato lavoro di LUPARINI (1939) — differiscono da quelle delle specie elencate nella monografia della STELLING—DEKKER (1931), fermentando glucosio (levulosio, mannosio), galattosio e maltosio. Differense pure si hanno con **Hansenula nivea** e **H. panis** (questa, peraltro, assai vicino ad **H. Schneggii** (Weber) Dekker) posteriormente descritte da Castelli.

8) **Ceppo N. 45.** Torulopsis Molischiana (Zikes) Lodder.

Isolato 9 volte (circa 7 % di frequenza). Produce l'1,40% di alcole etilico in peso.

Fu descritto come **T. Molischiana** var. **liquefaciens** Luparini per la lenta liquefazione della gelatina, con le seguenti caratteristiche ; „Cellule che nelle giovani colture in mosto e in malto si presentano di forma globosa o ovata, gemmanti, quasi sempre isolate ma anche riunite in gruppi di 2 o 3 individui. Dimensioni medie 2,4—3,5 μ. Nelle colture su mosto e su malto si ha forte intorbidamento, attiva fermentazione e deposito. Negli strisci su terreni solidi e nelle colonie giganti si producono patine abbondanti, granulose, grigiastre. Temperatura ottima per lo sviluppo 25° C.

Fermenta attivamente il glucosio, il levulosio e il mannosio. Non fermenta il saccarosio, maltosio, lattosio, galattosio. La liquefazione della gelatina avviene molto lentamente e tardivamente."

Un più completo studio diede le seguenti caratteristiche.

Su agar-malto al 7° giorno. Patina superficiale bianca, esile, poltaca, ad orlo continuo o lobato. Cellule tondeggianti o subovali, più o meno vacuolate, con marcato polimetricismo, variando le dimensioni da 1,5 a 3,5 μ pur essendo le cellule più grandi meno frequenti.

Su malto liquido al 15° giorno. Anello e deposito, non pellicola. Liquido torbido con nubecole. Cellule rotonde o tozzamente ovali, di 2,8 = 3,5 μ di diam.

	Fermentazioni gas	ac.	**Assimilazione** in acqua di dievito più:	
Levulosio	+	+	levulosio	+
Destrosio	+	+	destrosio	+
Mannosio	+	+	mannosio	+
Saccarosio	—	—	saccarosio	+
Galattosio	—	—	galattosio	+
Maltosio	—	±	maltosio	+
Raffinosio	—	—	raffinosio	±
Lattosio	—	—	lattosio	—

assimilazione delle fonti di azoto in soluzione glucosata più:		assimilazione in acqua di lievito	assimilazione di acidi e sostanze grasse:	
peptone	+	+	ac. margarico	—
asparag.	±	+	„ oleico	+
urea	—	—	„ stearico	—
nitrato K	+ (scarsa)	—	stearina	—
solfato	+ (id.)	—	palmitina	—

Per quanto in effetti la **T. Molischiana** sembri incapace di liquefare la gelatina, una distinzione, anche come varietà, del ceppo in studio, basata su questo solo carattere (e per di più manifesto tardivamente e leggermente) ci pare accesiva. Anche il fatto che le colture liquide sieno poco o non vischiose è carattere da ritenersi secondario.

A questa stessa specie è da rifirire il **Ceppo n. 49**, isolato 10 volte (circa 8 % di frepuenza), che produce l' 1,45 % di alcole in peso, da LUPARINI (1939) indicato [al n. 10] come **Torulopsis** sp. con queste caratteristiche: „Su malto e su mosto, cellule prevalentemente globose, rotondeggianti, quasi sempre isolate ma anche riunite in gruppi di molti individui, mai formanti micelio, delle dimensioni medie 2,4—2,6 μ. Nelle culture su terreni liquidi si ha forte intorbidamento, attiva fermentazione e deposito; in superficie piccola formazione di anello risaliente. Negli strisci su agar e nella colonia gigante si nota la formazione di una patina molto scarsa, mucosa, di colore bianco-grigiastro.

Fermenta attivamente glucosio, levulosio, mannosio. Non fermenta saccarosio, maltosio, galattosio, lattosio. Non liquefà la gelatina."

9) **Ceppo N. 53.** Torulopsis oleifabricae nob., n. sp. [1])

Isolato 11 volte (frequenza 9 % circa); produce l' 1 % di alcole etilico in peso. Descritto in precedenza con la seguente diagnosi: „Le cellule, su infuso di malto e su mosto, si presentano globose, rotondeggianti, isolate o riunite in gruppi di numerosi individui, delle dimensioni medie di 2,5—3,6 μ. Nei terreni liquidi dapprima leggero intorbidamento e filosità, poi massa torbida a fermentazione. Negli strisci su agar come pure nella colonia gigante si nota la formazione di patine grigiastre, lucide, granulose e piuttosto abbondanti.

Fermenta attivamente il glucosio, levulosio, mannosio e scarsamente il galattosio. Non fermenta il saccarosio, maltosio e lattosio. Non liquefà la gelatina."

Benchè il ceppo sia stato perduto prima che fosse stato possibile studiarne le assimilazioni, dato che le poche specie descritte quali capaci di fermentare i soli monoesosi differiscono dal ceppo da noi studiato esso, „ad interim", viene definito nuova specie.

10) Torulopsis stellata (Kr. et Kr.) Lodder.

Coincide bene per tutte le caratteristiche con la specie quale descritta in LODDER (1934), oltrechè per le cellule che qui sono isolate o molto brevemente catenulate, mentre nel ceppo originale, secondo LODDER, forma catenette più lunghe. Ma tale caratteristica è di scarso valore differenziale, sì che non possiamo tenerne conto.

Su agar fagiuoli al 7° giorno. Patina superiormente bianca lucente opaca, poltacea; ad orlo continuo. Cellule subrotonde, ovali o subovali, mai ellittiche con plasma omogeneo o vacuolato; misurano μ (1,7—2,5) = (2,2—3,5).

Su malto al 15° giorno. Non forma pellicola, ma un sottile anello. Liquido limpido, con deposito al fondo. Cellule c.s. ma generalmente rotonde, con vacuolo e goccia di grasso.

	Fermentazioni		**assimilazioni**	
	gas	ac.	in acqua di lievito più:	
Levulosio	+	+	Levulosio	+
Destrosio	+	+	Destrosio	+
Mannosio	+	+	Mannosio	+
Saccarosio	+	+	Saccarisio	+
Lattosio	—	—	Lattosio	—
Raffinosio	—	+	Raffinisio	+ (poco)
Galattosio	—	+	Galattosio	+
Maltosio	—	+	Maltosio	+

[1]) Torulopsis oleifabricae nob., n. sp. In musto uvarum et in malto, sedimentum viscosum efformans. In agaro musto et agaro malto, nec non in coloniis giganteis cultura griseola granulosa, margine glabrato. Cellulis rotundatis, 2,5—3,6 μ diam., isolatis vel manifeste conglobatis. Fermentatio dextrosi (laevulosi, mannosi) et leviter galactosi. Gelatina non liquata. Hab. in „aqua vegetationis" olivarum confectarum, Perusiae (Italia media).

Assimilazione sostanze azotate in soluzione minerale glucosata più:		in acqua di lievito	Assimilazione sostanze grasse	
peptone	+	+	ac. margarico	—
asparag.	—	—	„ oleico	+
urea	—	—	„ stearico	—
nitrato K	±	+ (scarsa)	stearina	—
solfato NH_4	—	—	palmitina	—

11) Candida monosa (Kluyv.) Diddens et Lodder.

Su agar fagiuoli dopo 7 giorni. Patina non molto estesa, bianca, opaca, di aspetto ceroso, liscia, ad orli degradanti, mostranti, a piccolo ingrandimento, sottili frastagliature. La patina si approfondisce nel substrato.

Il reperto microscopico indica presenza di elementi allungati e vacuolati di μ 2,5—3,8 = 10,6—14,6, misti a cellule piccole, ovali o subrotonde, anch'esse vacuolate di 1,8—2 = 2,2—5,3 μ. Non forma spore.

In malto al 3° giorno. Anello molto spesso, risaliente; pellicola esile e labile all'agitazione. Liquido torbido e grumoso; al fondo un denso deposito. Sviluppo di gas. Apparato filamentoso molto bene sviluppato per ifi lunghi sino a 35—40 μ misti ad elementi cellulari generalmente ellittici od ovali, meno frequentemente subrotondi, di μ 1,7—1,9 = 3,5 circa. **Al 15° giorno:** in superficie pellicola consistente, spessa, grinzosa. Reperto microscopico come il precedente.

Su agar fagiuoli striscio sotto olio oliva al 7° al giorno. Come senza olio, ma con margini più frastagliati; in tal caso, la patina non si approfondisce. Al microscopio notansi pseudoifi lunghi sin 23—25 μ spesso ricurvi, misti a blastospore di forma irregolare, in ogni caso munite di piccole gocce eleose. È di particolare interesse rilevare come si osservino di frequente cellule irregolari, insolite.

Id. sotto olio di vaselina al 7° giorno. Caratteri colturali come sopra. Il reperto microscopico indica trattarsi di una vegetazione tipo **Mycocandida**, come figurato nella Tavola.

Colonia gigante su agar fagiuoli dopo 15 giorno. Svilupata appena di 1 cm. di diametro, tondeggiante, semi-trasparente, piatta al centro con striscia marginale, fortemente lobata. Micromorfologia molto varia. Scorrendo i margini si rinvengono ora formazioni arborescenti richiamanti, grosso modo, l'aspetto di **Mycotoruloides**; formazioni omogenee costituite da ammassi di blastospore rotonde, ovali o subellittiche, di dimensioni assai varie, o formazioni filamentose richiamanti quella di **Mycocandida.** Tutte queste formazioni si alternano o si sovrappongono senza norma. Gli elementi allungati che si formano sugli agar (anche nelle colture a striscio) si presentano, il più delle volte, arcuati invece che diritti. Tale osservazione che, d'altronde, si è fatta anche in malto dopo il 1° giorno, si è voluta sottolineare.

Agar malto al 5 giorno. Estesa sino a 2,5 cm. di diametro circa, subrotonda, piuttosto densa, poltacea, opaca, bianca; al centro è quasi piatta e non presenta particolari strutture. Verso la periferia si nota una parte più esterna color crema, degradante, a contorno leggermente striato e margini lobati con solchi radiali, sopra la quale si sovrappone la vegetazione della parte centrale di color bianco candido, a margine dendroide.

Carota al 7° giorno. Sviluppo di patina bianco-sporca, invadente, sottile, poltacea, liscia; apparato micelico ben sviluppato con blastospore di circa 2,8—3,5 = 3,5—7,1 μ essendo ovali o cilindriche.

Id. sotto olio di vaselina e d'oliva. Sviluppo scarsissimo, quasi nullo.

Patata al 7° giorno. Sviluppo di patina molto limitata, sottile, poltacea, di color bianco-sporco. Apparato micelico ridotto e formato da elementi più corti e tozzi. Blastospore come su carota.

	Fermentazioni		assimilazioni in acqua
	ac.	gas	di lievito più:
glucosio	+	+	+
levulosio	+	+	+
mannosio	+	+	+
saccarosio	±	—	+
galattosio	—	—	+
lattosio	—	—	—
raffinosio	—	—	—
maltosio	±	—	+

Assimilazione azoto in soluzione minerale glucosata:		Assimilazione sostanze grasse	
più peptone	++	Ac margarico	—
asparag.	+++	„ oleico	+
urea	—	„ stearico	+
nitrato K	—	Stearina	±
solfato NH_4	—	Palmitina	—

Ancorchè differisca dalla **M. monosa,** quale descritta da KLUYVER e da HARRISON, ma sopratutto di DIDDENS e LODDER (1942) [sub **Candida**] per le assimilazioni delle sostanze carboidrate ed azotate, coicide molto bene per le altre caratteristiche, e non stimiamo che le differenze sieno tali da dover distinguere il ceppo in studio dal tipo. notevole che due acidi grassi ed un gliceride siano assimilati.

12) Candida olei (v. Tiegh.) nob., n. comb.

Su agar-malto e su agar al brodo di fagiuoli dopo 15 giorni. Patine superficiali bianche, opache, poltacee, non lisce ma cerebroidi e con orli frangiati. La patina si addentra in profondità del substrato; ed ha un orlo della vegetazione profondo, frangiato. Il reperto microscopico rivela presenza di pseudoifi piuttosto irregolari di μ 14—18 = 1,7—3,5, misti a cellule pleomorfiche e polidiametriche, subrotonde, ovalari o ellittiche misuranti da μ 1,7 = 3,5 a μ 3.5 = 5.3. Scorrendo i bordi a piccolo ingrandimento appaiono formazioni abbondanti del tipo **Mycotorula.**

Agar fagiuoli sotto olio di vaselina e olio di oliva dopo 12 giorni. Sviluppo ma non molto abbondante di patina liscia bianca. Apparato micellare abbondante e bene sviluppato. Blastospore ovali o ellittiche, vacuolate, di media 2,8 = 5,3 μ o anche di diverso diametro.

Su fettine di patata al 15° giorno. Sviluppo limitato ad una patina un poco sopraelevata, bianca, poltacea, con orlo lobato o leggermente solcato.

Su fettine di carota al 15° giorno. Sviluppo abbondante di patina bianco-crema, rilevata, di aspetto mesenteroide per presenza di numerose pliche.

In malto. Liquido semi-fioccoso; deposito molto abbondante; anello denso, specie se vecchio. Pellicola labile.

In olio di oliva. È questa la sola specie — tra tutte quelle isolate — che, coltivata in olio di oliva liquido, produce una discreta, benchè lenta, vegetazione di fondo, con fiocchetti, poi con discretamente abbondanti fiocchi e un deposito quasi pulverulento assieme di grumi e squame che finalmente diviene pastoso, mentre l'acidità dell' olio aumenta pregressivamente. Il deposito è ricco di acidi grassi superiori, presenti come grumi e scaglie, ciò che conferma la progressiva saponificazione. A questo punto l'olio, dapprima appena torbido, è nettamente lattiginoso.

Fermentazioni

	gas	ac.	in acqua di lievito
levulosio	+	+	più levulosio +
destrosio	+	+	glucosio +
mannosio	+	+	mannosio +
saccarosio	—	—	saccarosio +
galattosio	—	—	galattosio +
maltosio	—	+	raffinosio +
lattosio	—	—	maltosio +
raffinosio	—	+	lattosio + (scarso)

Assimilazioni

in:	acqua di lievito	soluzione minerale glucosata
sostanze azotate		
peptone	—	+
aspar.	—	—
urea	—	—
nitrati	—	—
solfato NH_4	—	—

sostanze grasse	
ac. margarico	+
„ oleico	+
„ stearico	+
stearina	+
palmitina	+

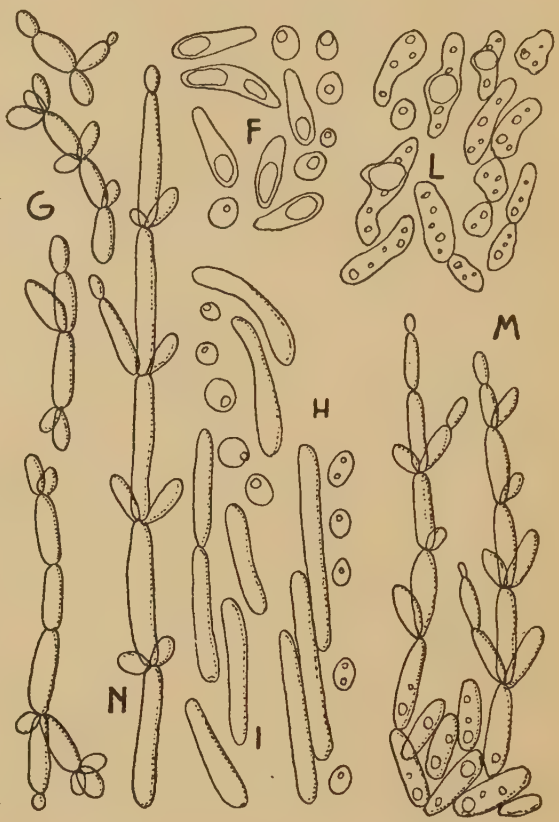
Non ci nascondiamo che il tentativo di reidentificare questo ceppo con il **Saccharomyces olei** v. Tieghem (Bull. Soc. Bot. France, 28, 70—71, 1881; ibid. 137, 1881), costituisca un'interpretazione relativamente azzardata. La descrizione di VAN TIEGHEM, redatta secondo lo stile e le conoscenze del tempo, non indica la formazione di ascospore, mentre si identifica la specie come un **Saccharomyces**, allora non distinguendosi le forme ascosporiche da quelle anascosporiche. Le sole caratteristiche del lievito sono indicate nelle colture in olio di oliva, con cellule ovate, catenulate o libere, di 2,5—4 μ diam. caratteristiche che coincidono abbastanza bene con quelle rilevate e proprio al nostro ceppo.

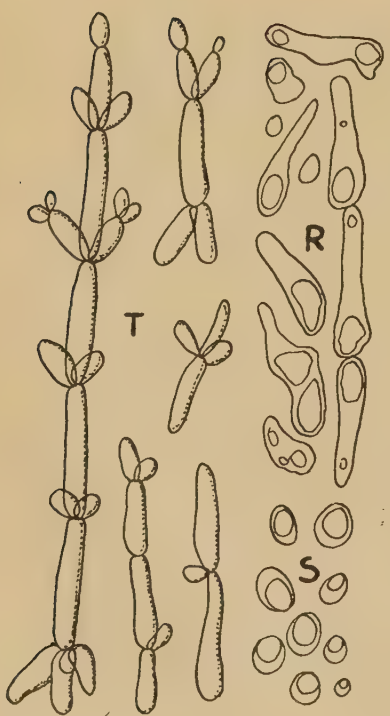
Summary

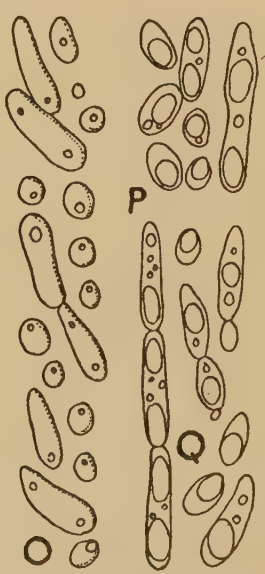
From the so called „vegetation waters" (waters containing mineral-chiefly potash salts and about 3 % of fermenting sugars), obtained from olive fruits by centrifugation or by other separation methods from olive oil, 138 yeast strains, were isolated and studied. The species and frequencies of isolation were:

1) *Torulopsis Holmi* (Joerg.) Lodd. 11 % frequency.
2) Anascosporic stage of *Zygosaccharomyces mongolicus* Saito. 10 % frequency.
3) *Trichosporon fermentans* Diddens et Lodder. 15 % frequency.
4) *Zygosaccharomyces mongolicus* Saito, once isolated in well ascosporigenous strain.
5) *Torulopsis Holmi* (Joerg.) 13 % frequency. Strains a little differing from the previously quoted N. 1.
6) *Saccharomyces Rouxi* Boutr. 15 % frequency. A. tentative reidentification of this old, previously described species, chiefly on the base of fermentation characteristics.
7) *Hansenula Castellii* nob., n. sp. 11 % frequency. A species well distinct from the other species of the same genus, on the base of fermentative characteristics.
8) *Torulopsis Molischiana* (Zikes) Lodder, in two strains, both a little differing from the type, with the relative frequency of 7 and 8 %.
9) *Torulopsis oleofabricae* nob., n. sp. 9 % frequency. Quite well distinct from other species of the same genus for the fermenting power on various sugars.
10) *Torulopsis stellata* (Kr. et Kr.) Lodder. One isolation.
11) *Candida monosa* (Kluyv.) Diddens et Lodder. One isolation.

B
A
C
E
D


F
L
G
M
H
N
I


R
T
S


P
Q
O

12) *Candida olei* (v. Tiegh.) nob., n. comb., a tentative reidentification of the old, unrecognized van Tieghem or species *Saccharomyces olei,* chiefly on biochemical characteristic. Of all species studied in olive oil culture or under oil, this is the only species with high lipasic power, with increasing acidity and oil saponification of olive oil, as ascertained by the French student.

Letteratura citata

CIFERRI R. e REDAELLI P. (1935) Arch. f. Mikrobiol., **6** (1). —
DIDDENS H. A. und LODDER J. (1942). **Die anaskosporogenen Hefen** (Hefesamml.) etc. **2**) 1—511. Amsterdam. —
LUPARINI F. (1939) L'Olivicoltore, **16,** (8) 1—12 (estr.). —
REDAELLI P. e CIFERRI R. (1941). Mycopath., **3** (2), 203—217. —
RENNERFELT E. (1941) Säntryck Svenska Skogsvaerdessför. Tidskr. (1), 1—94. —
STELLING—DEKKER N. M. (1931). **Die sporogenen Hefen** (Hefesamml. etc. **1**) 1—347. Amsterdam. —

Spiegazione della tavola

ZYGOSACCHAROMYCES MONGOLICUS Saito

A) cellule da colonie su agar fagioli al settimo giorno
B) cellule da colonia su malto al terzo giorno
C) cellule da deposito in malto al quindicecimo giorno
D) cellule in agar fagioli al quindicesimo giorno
E) cellule di colonie su agar fagioli sotto olio di vaselina al settimo giorno.

CANDIDA MONOSA (Kluyv.) Diddens et Lodder

F) cellule su agar fagioli al settimo giorno
G) cellule su malto in goccia pendente dopo 24 ore
H) cellule su malto al terzo giorno
I) cellule sullo stesso al 15° giorno
L) cellule su agar fagioli sotto olio d'oliva al settimo giorno
M) cellule su agar fagioli sotto olio di vaselina
N) cellule in malto in goccia pendente al terzo giorno.

TORULOPSIS MOLISCHIANA (Zikes) Lodder

O) cellule su agar malto al quindicesimo giorno
P) cellule su agar carote al settimo giorno
Q) cellule su agar patate al settimo giorno.

CANDIDA OLEI (v. Tiegh.) nobis

R) cellule su agar malto al settimo giorno
S) cellule su agar fagioli sotto d'oliva al ventiduesimo giorno
T) cellule su agar al brido di fagioli al settimo giorno.

Microflora blastomicetica dei tabacchi [1])

di

M. GIOVANNOZZI

(dalla Sezione di Zimologia dell'Istituto Scientifico Sperimentale per i Tabacchi — Scafati)

(con 1 tavola)

(1. 1. 1947)

Quando si è citato l'accenno che ne fece BEHRENS (1), lo studio di ROSSI (2) e quello di KOSSOWICZ (3) si è detto quanto fino al 1935, dopo un quarantennio di studi sui tabacchi, risultavt di noto circa la microflora blastomicetica di essi. BEHRENS si limitò a far noto che nel tabacco in fermentazione si ritrovano batteri, dieviti e funghi e che accanto ad una forma di *Monilia* (molto simile alle Monilia candida HANSEN) riscontrò, ma in assai minor numero, una Torula a pigmento roseo della quale non dette alcuna descrizione, indicandola però come sprovvista di capacità fermentativa. ROSSI rivolse la sua indagine sulla fermentazione del tabacco Kentucky quale viene effettuata nelle Manifatture dello Stato Italiano per la preparazione del ripieno adatto alle confezione dei sigari „toscani". Egli notò che la flora blastomicetica raggiungeva un importante sviluppo subito dopo poco che il tabacco è posto a fermentare, ma escluse — come precedentemente già aveva dichiarato LOEW (4) — che sviluppi microbici si verificassero nell'interno del tessuto fogliare e fece presente che al primo rivolgimento della massa di tabacco in fermentazione, giunta la temperatura a 35°—40°, i blastomiceti si conservano sempre, ma tendono a scarseggiare, le forme gemmanti si fanno rare, le cellule rimpiccoliscono, il protoplasma diventa granuloso; e cioè la cellule prendono l'aspetto di forme involute e che con l'avanzare del processo fermentativo assumono sempre più una fisonomia degenerativa. ROSSI ritenne di riferire questi blastomiceti al genere *Saccharomyces* e diagnosticò la nuova specie *Sacch. nicotianae* con la seguente descrizione: cellule rotonde o leggermente ovali di 2—3 μ, anaerobio facoltativo, gramresistente, coltivato su gesso non sporificò, in gelatina carne colonie bianche a forma di goccia, in brodo intorbidamento e deposito abbondante filante, in mosto leggero intorbidamento con deposito abbondante bruno gialliccio filante e velo alla superficie, il latte non coagula, su patata patina abbondante spesso ben rilevata che prima chiara poi imbrunisce; striscio su agar color grigiastro tendente al marrone chiaro, non produce indolo, non idrogeno solforato, non presame, invertina e diastasi saccarificanti.

KOSSOWICZ esaminò tabacco da fiuto e foglie di tabacco fermentato

---

1) Crediamo opportuno inserire nella presente rivista questo lavoro riassuntivo del Prof. GIOVANNOZZI sulla flora dei lieviti del tabacco-cui si è specialmente dedicato-per i possibili nessi epidemiologici tra le blastomicosi umane e tale flora. Dimostrata, ormal, la scarsa o nulla specificità dei lieviti usuali per l'uomo, e i sempre più frequenti nessi tra flora blastomicetica dell'ambiente e forme patogene per l'uomo e gli animali, appare evidente il notevole interesse che sempre offrono gli studi intesi a mettere in evidenza i lieviti esistenti nelle sostanze usualmente a contatto con l'uomo (N. d. R.)

inoculando del materiale in malto di birra sterile e allestendo scatole Petri con gelatina e agar di malto; così isolò dei lieviti morfologicamente molto simili al tipo cerevisia, alcuni altri di forma ovale-ellittica e una piccola torula. Egli ritenne che tali lieviti esercitassero un'influenza sull'aroma del tabacco, specie nella produzione di polveri da fiuto.

Nel 1935 rendevo noto (5) che l'esame di sezioncine di foglie di Kentucky in fase di fermentazione ammoniacale (cioè quella di Manifattura), eseguite al microtomo previa inclusione in paraffina e di spessore non superiore ai 3 μ, dopo colorazione con violetto di genziana in soluzione acquosa molto diluita (0,005 % per 7'—9') rivelava senza alcun dubbio, contrariamente alle affermazioni di LOEW e ROSSI, che oltre che in aderenza all'esterno del dessuto fogliare anche nell'interno di questo si notano piuttosto frequentemente delle coloniette di microrganismi che per i loro caratteri morfologici sono da riportare a cocchi ed a blastomiceti. Le forme dei lieviti apparivano piuttosto rotonde regolari più o meno grandi. Un successivo studio (6) mi confermava che lo sviluppo di questi blastomiceti era particolarmente abbondante nei primi tempi della fermentazione mentre con il procedere di questa diminuivano rapidamente sino a rendersi assenti quando la temperatura delle masse facevasi più alta e quando il pH del tabacco, in conseguenza del processo fermentativo, da leggermente acido che era all'inizio (pH = 6—6, 8) raggiungeva la neutralità e successivamente un grado alcalino (pH 7, 5—8). Dalla enumerazione di questi blastomiceti a mezzo del metodo colturale potei stabilire per la prima volta l'entità di detto sviluppo numerico che mi si dimostrò piuttosto variabile, ma comunque oscillante tra le cifre di centinaia di migliata e di alcune decine di milioni per gr. di tabacco sostanza secca. Per la conta e l'isolamento di questi blastomiceti del tabacco mi corrispose bene una particolare gelatina costituita con decotto al 10 % di tabacco Kentucky fermentato + 0.5 % di peptone + 1 % di glucosio + 0,2 % di acido tartarico (7).

Il successivo studio (8) mi portò a concludere che trattavasi di saccaromiceti riferibili al Gen. *Debaryomyces*. Sia per il fatto che la coltura di *Sacch. nicotianae* ROSSI non era reperibile, come per non dare ROSSI alcuna indicazione sulla capacità fermentativa del suo blastomicete e l'aver riferito che saggiato su blocchetti di gesso non sporificò, non potei stabilire alcun confronto tra i miei stipiti e quello descritto da ROSSI il quale potrebbe anche darsi che fosse stato in realtà un vero saccaromicete e precisamente un *Debaryomyces* poiché è riconosciuto che le specie appartenenti a questo genere sporificano soltanto dopo parecchi giorni (30 e più) sui substrati agarizzati (agar GORODKOWA) e non sul gesso che fu l'unico substrato usato da ROSSI.

L'identificazione dei miei stipiti fu condotta con la ricerca dei caratteri morfologici, colturali e biochimici secondo i moderni metodi che la tecnica consiglia; inoltre mi fu possibile fare un confronto diretto circa la capacità fermentativa e l'utilizzazione dei vari zuccheri con le specie: *Deb. globosus, membranaefaciens, Guilliermondii* e *tyrocola* che gentilmente mi furono inviate dal Chm. Prof. A. KLUYVER Direttore del Centraalbureau voor Schimmelcultures di Delft. Da tali ricerche ritenni in ultimo che i lieviti da me isolati potevansi considerar una nuova specie di *Debaryomyces* che denominai *Deb. nicotianae* n. sp. e della quale fornii la seguente diagnosi:

Debaryomices nicotianae n. sp.

Cellule generalmente rotonde, ma alcune colte ovali in media di 3,5—5,5 μ e talvolta anche macrocellule di 7—8, 7 μ ed anche di 10 μ. Subito produzione di abbondante velo sottile asciutto grinzoso, risaliente, ed abbondante deposito. Aschi derivanti per copulazione con lieve eterogamia, di 3,2—3,5 μ e spore di 2,7 con goccolina oleosa nel centro: una spora per asco.

Debole fermentazione di destrosio levulosio, mannosio e saccarosio, dubbia per il maltosio, Sviluppa in agar nutritivo sintetico con aggiunta quale unica sorgente di carbonio, di destrosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio e maltosio. Assimilazione dei nitrati negativa. Con alcool etilico come alimento discreto sviluppo sotto forma di solo deposito. Patina culturale dello striscio su agar al decotto di malto (75 giorni a 15° C.) diffusa, piatta di colore cretoso-giallastro (147) [1]) con formazioni bollose irregolarmente distribuite, lucente, leggermente umida. Non fluidifica la gelatina, non produce indolo, non riduce i nitrati. Le colture in infuso di malto rendono il liquido culturale di colore giallo-cedrino (236); tale colorazione non si produce in altri substrati, nemmeno in decotto di malto. Temperatura mortale delle cellule vegetative 10' a 50° C. delle spore 10' 56° C. Sviluppo dalle culture di grato leggero odore etereo.

Habitat: in tabacco Kentucky in fermentazione.

Un secondo stipite, che differisce dal *Deb. nicotianae* per presentare cellule costantemente più rotonde e più piccole (2—5, 2μ); e per alcuni caratteri culturali tra cui patina dello striscio su agar malto al 75° giorno a 16° C.. piatta, diffusa, liscia, di color bianco pallido rosea (103 A) poco lucente; per una maggiore resistenza alle temperature (temp. mortale cellule vegetative 10' a 54° C.), e agli agenti chimici saggiati, lo considerai una varietà del primo e poiché presenta cellule generalmente un po' più piccole, ne proposi la denominazione in: *Debaryomyces nicotianae* var. *minor* n. sp. et n. var.

Nel corso di altre ricerche microbiologiche (9) condotte su tabacco Maryland proveniente dalle coltivazioni di Cava dei Tirreni, ebbi occasione di isolare nell'ottobre 1940 altri sei stipiti di blastomiceti che mi sono risultati appartenere anch'essi al genere *Debaryomyces*. Gli isolamenti furono operati dalle piastre di cultura per la numerazione dello sviluppo microbico che si era manifestato in tale tabacco dopo che ne era stato determinato un leggero processo fermentativo mantenendolo in recipienti a pareti porose (silos DONADONI) previo inumidimento con acqua semplice. Le conte mi mostrarono che le forme blastomicetiche in parola avevano raggiunto lo sviluppo numerico di 1.500.000 per gr. di tabacco sostanza secca: dunque anche questa volta durante un processo fermentativo dei tabacchi si verificò un sensibile sviluppo della microflora blastomicetica rappresentata da forme di saccaromiceti riferibili all'unico genere indicato.

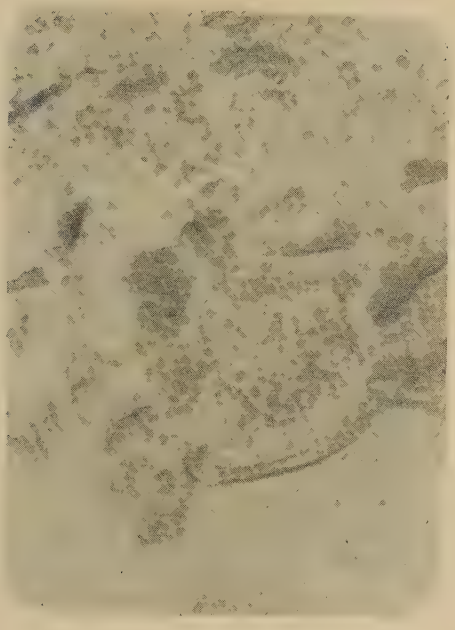
Lo studio sistematico di questi altri lieviti isolati mi portò a stabilire le seguenti identificazioni:

Due stipiti erano da riportarsi al *Deb. Matruchoti* GRIGORAKI et PEJU, mentre un altro stipite era da ritenersi una nuova specie che denominai *Debaryomyces Marylandii* n. sp., e per il quale detti la serguente diagnosi:

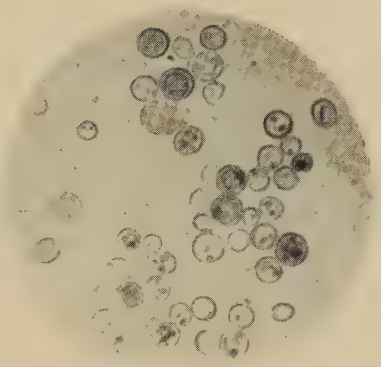
Debaryomyces Marylandii n. sp.

Cellule quasi sempre rotonde di 2—5,2 μ in media di 3—3,5 μ di diametro. Aschi derivanti per copulazione isoeterogamica, aschi di misura varia di 3,2—3,6 μ e talvolta,

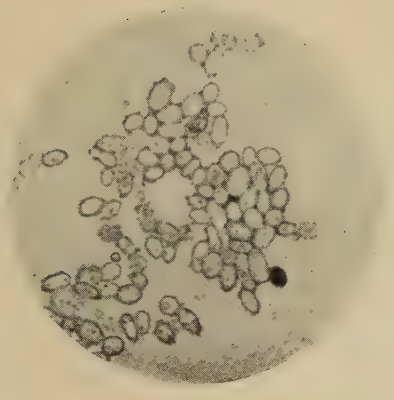
[1]) Questo numero tra parentesi e tutti gli altri che si troveranno ugualmente nel corso della presente nota, corrispondono alla sfumatura di colore indicata nel catalogo „Code des couleurs" di Klinchsiech e Valetta (Paris, 1908).



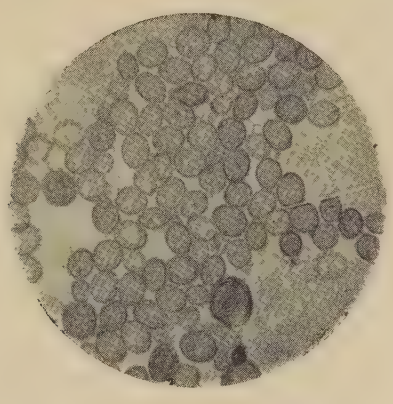
1



2



3



4

Fig. 1 — Sviluppo di blastomiceti nell'interno del tessuto di foglia di Kentucky in fase di fermentazione (circa 800 ×).
Fig 2 — Cellule di **Debaryomyces nicotianae** var. **minor.** Colorazione vitale con B.M. (740 ×).
Fig 3 — Cellule di **Rhodotorula mucilaginosa** var. **Kentuckyi** Col. vitale con B.M. (740 ×).
Fig 4 — Cellule di **Rhodot. polymorpha**. Col. vit. con B.M. (740 ×).

rari, di 4—5 μ di diametro, rotondi o leggermente ovali, con spore anche di misura varia di 2—3,5 μ con gocciolina oleosa nel centro, una spora per asco. La sporificazione è sempre in altissima percentuale e si verifica con grande facilità su quasi tutti i substrati.

Nessun zucchero viene fermentato. Sviluppa in agar nutritivo sintetico con aggiunta quale unica sorgente di carbonio di glucosio (l.m.), galattosio, saccarosio e maltosio: e quale unica sorgente di azoto, di peptone, asparagina, solfato ammonico. Assimilazione dei nitrati negativa. Patina culturale dello striscio su agar al decotto di malto: diffusa, piatta, dapprima bianca poi di colore cretoso scuro roseo. Nelle culture liquide sempre produzione di esile velo asciutto bianco risaliente. Non fluidifica la gelatina.

Habitat: in tabacco Maryland in fermentazione.

Gli altri tre stipiti potevano considerarsi ancora una nuova specie, che denominai *Deb. Cavensis* e dalla qualle detti la seguente diagnosi:

Debaryomices Cavensis n. sp.

Cellule prevalentemente rotonde generalmente piccole di 2—2,5 μ. In culture liquide non produce velo e solo una esile traccia di velo, difficile e scarsa sporificazione con copulazione iso- o leggermente eterogamica, aschi di 3,2—3,5 μ con una spora per asco di $\pm$ 3—3,2 μ con gocciolina oleosa al centro.

Fermentazione debole solo di glucosio (l.m.) e saccarosio. Sviluppa in agar nutritivo sintetico con aggiunta quale unica sorgente di carbonio: di glucosio (l.m.), galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosio, non di lattosio; e quale unica sorgente di azoto: di peptone, asparagina, solfato ammonico. Assimilazione dei nitrati negativa,

Patina culturale dello striscio su agar malto limitata, abbondante, rilevata, dapprima bianca poi per tutta la zona centrale di color cretoso con riflessi vinosi. Non fluidifica la gelatina.

Habitat: in tabacco Maryland in fermentazione.

Tutte le mie osservazioni condotte in parecchi anni di studi sui tabacchi, mi portano a ritenere che la flora blastomicetica di essi, e che assume una certa importanza per lo sviluppo numerico durante il periodo di fermentazione, è rappresentata solamente da specie di *Debaryomyces*. Non mi consta che altri abbia messo in evidenza questa nozione e pertanto risulterebbero interessanti ulteriori ricerche, anche sui tabacchi di altre Nazioni, per appurare se è da ritenersi di natura veramente generale il fatto che quella che sembra essere la flora blastomicetica specifica dei tabacchi sia rappresentata da sole forme riferibili al genre *Debaryomyces*.

Rendo però anche noto che con i primi studi del 1935 accanto ai *Debaryomyces* ebbi a riscontrare ed a isolare quattro stipiti di *Rhodothorula*. A questo tipo di blastomiceti, almeno per ora, non posso attribuire alcuna importanza nei confronti della fermentazione dei tabacchi poichè li ho riscontrati solo rarissimamente ed in numero limitatissimo benchè la loro presenza non sia del tutto saltuaria. Però ho ritenuto di condurne lo studio sia per stabilire una prima base per eventuali studi su altri blastomiceti a pigmento rosa-rosso che in futuro si potessero isolare dai tabacchi, sia perchè viene a risultare che tra i blastomiceti asporigeni facenti parte della microflora dei tabacchi questi, per ora, sono gli unici rappresentanti riscontrati, sia perchè BEHRENS, come ho detto in principio, accennò di aver trovato nei tabacchi una torula rosa. [1])

[1]) Nel corso di alcune fermentazioni ad andamento poco soddisfacente sia di tabacco Kentucky sia di tabacco „Nostrano del Brenta" ho inoltre avuto occasione di isolare da vegetazioni che si presentavano macroscopicamente molto simili alle vegetazioni di **Oospora nicotianae** PEZZ. et SACC. e cio è sotto l'aspetto di piccolo coloniette circolari bianche farinose a tipo di calce sfiorita, alcuni stipiti di blastomiceti che per

Passo a riferire in merito a questi blastomiceti a pigmento rosa-rosso e che vanno riferiti all'unico genere *Rhodotorula* HARRISON della Famiglia delle *Rhodotorulaceae* istituita appositamente dalla LODDER (10) nel 1934, per raggruppare in un'unica famiglia tutti i lieviti asporigeni produttori di pigmento rosso di natura carotinoide.

Lo studio dei quattro stipiti mi portò a stabilire (11) che due di essi possono ritenersi una nuova varietà dello *Rhodotorula mucilaginosa* (JÖRG.) HARRISON e che pertanto denominai *Rhod. muc.* var. *Kentuckyi* nov. var.; un terzo stipite un'altra nuova varietà della stessa specie e che denominai *Rhod. muc.* var. *Scafattii*, ed infine la quarta *Rhodotorula* una nuova specie per la quale proposi il nome di *Rhod. polymorpha* n. sp.

Di tali nuove varietà e nuove specie, riporto qui in breve le relative diagnosi:

√ Rhodotorula mucilaginosa var. Kentuckyi nov. var.

Cellule rotonde o leggermente ovali; piuttosto piccole in media di 3—5 μ le rotonde, e di (3,5—7) × (3—5) μ le ovoidali, talvolta leggermente affusate ad un estremo. Mancano aschi e spore.

Sprovvisto di capacità fermentative. Il metodo auxanografico mostro assimilazione quale unica sorgente di C., di glucosio (l.m.) e saccarosio, scarsa di maltosio, negativa per il galattosio, il lattosio ed il raffinosio. Il metodo auxanografico mostro assimilazione quale unica sorgente di N., di solo peptone, con alcool etilico come alimento, sviluppo molto debole.

GRAM-positivo, non liquefacente, produce pigmento carotinoide rosa-rosso. Lo striscio su agar malto dà patina abbondante, lucente, mucosa, dopo 75 g. a 15° C. di color rosa corallo chiaro (28 B—C) talvolta con alcune chiazze irregolarmente disposte di color rosso (41). Le cellule sono uccise per una esposizione di 10' a 55° C.

Habitat: in tabacco Kentucky in fermentazione.

√ Rhodotorula mucilaginosa var. Scafatii nov. var.

Cellule rotonde o leggermente ovali, piuttosto piccole in media di 3—5 μ le rotonde, e di (3,5—7) × (3,5—4) μ le ovali.

Provvisto di capacità fermentative. Il metodo auxanografico mostra assimilazione quale unica sorgente di C. di: glucosio (l.m.) galattosio, maltosio, saccarosio, raffinosio e non di lattosio. Il metodo auxanografico mostra assimilazione quale unica sorgente di N. di solo peptone. Con alcool etilico come alimento sviluppo molto debole.

GRAM-positivo, non liquefacente, produce pigmento carotinoide rosa-rosso. Lo striscio su agar malto dà patina abbondante, lucente, mucosa, dopo 75 g. a 15° C. di color rosa fragola (28 D.).

Le cellule sono uccise per un'esposizione di 10' a 58° C.

Habitat: in tabacco Kentucky in fermentazione.

Rhodotorula polymorpha n. sp.

Cellule con aspetto sensibilmente polimorfo: cellule rotonde più o meno grandi (3—5 μ) od ovoidali leggermente appuntite ad un estremo di grandezze varie (2,5—8,5) × (2—4) μ, a volte alcune macrocellule rotonde di 7—12 μ, così pure alcune volte si notano cellule a forma di budelletti di (20—25) × (3—2,2) μ, a pera od a fiasco)22,75 × 12,2 μ.); altre claviformi (29 × 8,5 μ) o a bastone (19,3 × 3,5 μ) ed anche altre forme più o meno irregolari. Mancano aschi e spore.

---

i loro caratteri morfologici e culturali non risultano stipiti di **O. nicot.** ma sembra siano da riportarsi ai lieviti asporigeni e più precisamente alla sottofamiglia **Trichosporeae.** Anche per questo tipo di lieviti nei confronti del tabacco non esiste traccia nella letteratura precedente. Tali coloniette bianche notavansi piuttosto frequenti sui tabacchi quando, come ho detto, l'andamento fermentativo non era soddisfacente e si accompagnava alla comparsa di ammuffimenti della foglia più o meno intensi.

Sprovvisto di capacità fermentative. Il metodo auxanografico mostra assimilazione quale unica sorgente di C., di glucosio (l.m.) saccarosio, maltosio, raffinosio: non utilizza galattosio e lattosio. Il metodo auxanografico mostra assimilazione, quale sorgente di N., di peptone ed urea, non assimilati i nitrati né l'asparagina, incerto il comportamento con solfato ammonico. Col alcool etilico come alimento, il risultato è negativo.

Al GRAM, si comporta come specie GRAM-negativa. Ilquiefacente la gelatina, ma debolmente e solo dopo molto tempo. Dalle culture sviluppa leggero odore etereo.

Produce pigmento carotinoide rosa-rosso piuttosto delicate, con riflessi arancioni o giallastri. Lo striscio su agar malto dà patina che sviluppa lentamente che si presenta talvolta unita, ma più facilmente come colonie piuttosto grandi confluenti; dopo 75 g. a 15° C. di colore rosa giallastro (66).

E sensibile alle temperature; a 30° lo sviluppo è impedito; la temperatura mortale per un'esposizione di 10' è di 50° C.

Habitat: in tabacco Kentucky in fermentazione.

Da ricerche di studiosi americani NARHSKI, BEINHART, COUCH, comparse nel 1944 (12) anche risulta che durante i processi fermentativi del tabacco si nota lo sviluppo di lieviti accanto ad un forte sviluppo di micrococchi; nel caso di tabacchi da fiuto è anzi apparso che i blastomiceti sempre maggiormente si sviluppavano durante la fermentazione soppiantando quasi del tutto l'iniziale incremento dei micrococchi, con un comportamento cioè contrario a quello che si verifica nella fermentazione del tabacco per sigari di tipo italiano come gli stessi AA. americani hanno confermato.

Secondo altre mie indagini (13-14) l'aggiunta di colture pure della flora blastomicetica propria dei tabacchi (colture del *Debary. nicotianae)* ai tabacchi Kentucky grezzi può esercitare una favorevole influenza durante la conservazione dei tabacchi stessi nelle botti, migliorando non eccessivamente, ma in modo sensibile il profumo e l'aroma del tabacco trattato. Non mi consta che altri abbia tentata l'inoculazione ai tabacchi delle specie blastomicetiche costituenti la sua microflora caratteristica; invece nella letteratura si ritrovano tentativi di aggiunta di colture di altri lieviti quali il *Sacch. cerevisiae* e il *Sacch. ellipsoideus,* cioè del tipico lievito della birra e di quello della vinificazione. Già dalle notizie di BEHRENS appariva come alcune volte con l'aggiunta di sostanze zuccherine ai tabacchi fossero inoculati lieviti del genere *Saccharomyces;* si è anche fatta distinzione tra effetti determinati dall'ellittico o dal cerevisia, il quale ultimo, sec. KOLL e WAGNER (15), impartisce al tabacco da fiuto un odore sgradevole mentre il lievito di vino produrrebbe caratteri organolettici migliori.

Ricerche di STREET (16) del 1940 e altre di GRIBBINS; HALEY, REID (17) del 1944 parlano nuovamente in favore dell'aggiunta di colture di *Sacch. cerevisiae* nel senso che questo impartisce al tabacco un carattere di più completamente fermentato, aroma più piacevole, ed è capace di favorire la proliferazione batterica durante gli stadi preliminari della fermentazione con un contemporaneo maggior incremento di temperatura.

Secondo mie osservazioni l'aggiunta di lieviti del Gen. *Saccharomyces* ai tabacchi, non accompagnate da contemporanee conce zuccherine, è senza effetto. Sarà necessaria un'accurata sperimentazione per decire in proposito, comunque appare evidente come la microflora blastomicetica dei tabacchi si distanzi sensibilmente da quella aggiunta: il Genere *Debaryomyces* ha delle caratteristiche biochimiche, oltre che morfologiche e colturali, molto diverse dal Gen. *Saccharomyces,* e quindi i primi sono quelli dai quali verosimilmente è possibile attendersi un reale perfezionamento dei

tabacchi sia per l'azione diretta che essi possono esplicare sia per gli utili fenomeni di metabiosi che ne possono derivare con le altre associazioni microbiche che s'impiantano durante la fermentazione.

Riassunto

L'esame di tabacchi tipo Kentucky e Maryland in fermentazione ripetuto più volte nel corso di oltre un decennio ha mostrato che la microflora blastomicetia di essi è da ritenersi rappresentata da specie riferibili al Gen. **Debaryomyces.** Quelli isolati dal tabacco Kentucky in fermentazione, per la produzione dei sigari toscani, sono stati descritti come **Deb. nicotianae** n. sp., altri stipiti come una varietà di questa, denominata **Deb. nicotianae** var. **minor.** Anche dal tabacco Maryland in fermentazione furono isolate forme riportabili al **Gen. Debaryomyces.** Due di queste sono descritte come **Deb. Marylandii** n. sp. e **Deb. Cavensis** n. sp., una terza fu identificata col **Deb. Matruchoti** GRIGORAKI et PEJU. Lo sviluppo di questi lieviti è molto numeroso, raggiunge durante la fermentazione dei tabacchi le cifre da centinaia di migliaia ad alcune decine di milioni per gr. di tabacco sostanza secca. Nel tabacco Kentucky, in fase di fermentazione per sigari toscani, lo sviluppo si verifica nei primi stadi fermentativi ed è capace di avverarsi anche nell'interno dei tessuti fogliari; col procedere della fermentazione diminuisce rapidamente e quindi cessa. Altri rappresentanti della flora blastomicetica ma in scarsissimo numero, tale da non attribuirgli importanza pratica, sono dei lieviti asporigeni a pigmento rosa-rosso riferibili al Gen. **Rhodothorula** HARRISON. Di quattro stipiti isolati due di essi sono considerati una nuova varietà della **Rhod. mucillaginosa** (JORG). HARRISON e denominata quale var. **Kentuckyi,** un altro stipiti un'altra varietà della stessa specie designata come car. **Scafatii,** e il quarto stipite una nuova specie denominata **Rhod. polimorpha.** Infine vengono svolte delle considerazioni sugli effetti che possono determinare le aggiunte di colture di lieviti ai tabacchi.

Summary

Blastomycetic microflora of tobaccos.

The study of fermenting tobaccos of the Kentucky and Maryland types, often repeated in the course of ten years, could demonstrate that their blastomycetic microflora is to be considered as typified by species belonging to the **Debaryomyces** genus. The ones isolated by the Kentucky tobacco during its fermentation for the production of „toscani" cigars have been referred to as **D. nicotianae,** n. sp.; other strains as a variety of the former: **D. nicotianae** var. **minor.** Also by the fermenting Maryland tobacco have been ae isolated forms likely to be annexed to**Debaryomyces** gen. Two of the laater have been referred to as**D. Marylandi** n. sp. and **D. Cavensis** n. sp.; a third one has been identified as **D. Matruchoti** Grigoraki et Peju.

The growth of these yeasts is quite fair and reaches, during the fermentation, numbers of hundreds of thousands and even tens of millions of blastospores per gram of dry substance.

Other blastomycetes, considered however of a very little importance because of their neglectable number, belong to the genus **Rhodotorula** Harrison. Two of them are a variety of **R. mucillaginosa** (Jörg.) Harrison: **R. mucillaginosa** var. **Kentucky;** another is the **R. mucillaginosa** var. **Scafatii;** a fourth strain is typified by **Rhodotorula polimorpha.**

Bibliographia

1) BEHRENS — Centralb. f. Bakt. u. Paras. T. II, n. 16—17, 1896.
2) ROSSI G. — *Primo contributo allo studio della fermentazione del tabacco.* Modena 1900.
3) KOSSOWICZ — Centralb. f. Bakt. u. Paras. Ref. in T. II, Bd. 35, 1912, pag. 354.
4) LOEW — United *St.* Depart. of Agric. Washington, 59, 1899.

5) GIOVANNOZZI — Boll. Tecn. di Scafati, n. 2, 1935.
6) idm. — Boll. Tecn. di Scafati, n. 4, 1937.
7) idm. — Boll. Tecn. di Scafati, n. 4, 1936.
8) idm. — Boll. Tecn. di Scafati, n. 1, 1939.
9) idm. — Boll. Tecn. di Scafati, n. 3—4, 1941.
10) LODDER — Die Anascosporogenen Hefen, Amsterdam, 1934.
11) GIOVANNOZZI — Boll. Tecn. di Scafati, n. 3—4, 1941.
12) NAGHSKI J., BEINHART G., COUGH J. J. — Ind. and Eng. Chem., 36, n. 6, 1944, pp. 556—559.
13) GIOVANNOZZI — Boll. Tecn. di Scafati, n. 2, 1940.
14) idm. — Il Tabacco, n. 573, Aprile 1947.
15) KOLLER e WAGNER — cit. da BEHRENS: (LAFAR, Handbuch der tech. *Mycologie,* Jena, 1905, p. 19 in 5° Bd.)
16) ANDERSON P. J., SWANBACK T. R., STREET O. E. — Connecticut (New Haven) Stat. Bul. 433, 1940.
17) GRIBBINS M. J., HALEY D. E., REID J. J. — Jour. Agric. Res. Vol. 69, n. 9, 1944, p. 373—381.

Sopra alcuni aspetti morfologici di Candida pulcherrima (Lindner) Windisch

per

O. Verona e G. Florenzano

(dall'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica dell'Università di Firenze)

(con 1 tavola)
(28. 1. 1947)

In *Candida pulccherrima* (Lindner) Windisch la caratteristica morfalogica di maggiore rilievo è rappresentata dalla presenza, insieme alle cellule normali, di più grandi cellule solitamente provviste di grossa goccia oleosa. Tale presenza, pur variabile in rapporto alle altre cellule con circostanze che ricerche in corso vanno precisando, assume carattere quasi costante e, in un certo senso, ne rappresenta come sappiamo una caratteristica.

Gli studi di Windisch e, quindi, della Porchet, cogliendo alcuni aspetti morfologici di ceppi in variazione, mettevano in evidenza la formazione di uno pseudomicelio, il che giustificava il trasferimento della specie al genere *Candida* essende prima riferita al genere *Torulopsis* (vedi Diddens e Lodder).

Durante il corso di altre ricerche abbiamo avuto occasione di isolare più volte, da mosti d'uva e da mosti di frutta, numerosi ceppi di C.p.: tutti, peraltro, a morfologia normale ed in fase non filamentosa qualora se ne eccettui uno, siglato 69—T—13, proveniente da mosto d'uva e presentante cellule la cui forma doveva fermare la nostra attenzione anche per il fatto che essa sembre stabile permanendo da circa un anno nei più vari substrati e con i numerosi trapianti.

Si tratta di cellule, a parte le dimensioni variabilissime, quanto mai polimorfe, provviste spesso di appendici e costantemente a contorno irregolare. In brevi termini si tratta, come solitamente si dice, di cellule a forma ameboide.

Tale forma interessa le cellule normali, ma anche, sebbene più raramente, le più grosse caratteristiche cellule.

Evidentemente non è il caso di riportare tutti i rilievi eseguiti nei vari substrati e nelle periodiche osservazioni ritenendo sufficienti pochi riferimenti.

Malto — In malto, dopo 24 ore, cellule ovali o subsferiche di μ 5.2 × 5—6.7 generalmente isolate, ma gemmanti. Aspetto simile con il tempo e scarsa o assente presenza di cellule ameboidi.

Agar-malto — Cellule ovali di μ 5 × 5—7.5 miste a cellule globose provviste di grasso, di μ 7.5—12.5 di diametro. Abbondante presenza di cellule irregolari a forma ameboide, provviste di vacuoli e gocce di grasso (1 della fig.). Con l'invecchiamento tali cellule si fanno più abbondanti e più irregolari, fors'anche più grandi mentre presentano, spesso, appendici e prolungamenti (2 della fig.).

In qualque trapianto sono state repertate cellule di forma ameboide anche tra le grosse cellule spesso presentanti due anzichè una grossa goccia oleosa (7 della fig.).

Agar-fagiuoli saccarosato — Come in agar-malto; però, all'inizio, le cellule ameboidi sono meno abondanti.

Agar-Gorodkowa — Dopo 48 ore cellule generalmente ovali e gemmanti di μ 5 × 5—7.5 con scarsa presenza di cellule abnormi. Queste amentano tuttavia con l'invecchiamento: si presentano fortemente vacuolate, prive di gocce oleose (5 della fig.).

Patata — Cellule prevalentemente ovali; mancano le grosse cellule tipo „pulcherrima"; non, o molto scarse, cellule ameboidi; frequenti, invece, uno o più prolungamenti diversamente lunghi (6 della fig.).

Agar-glucosato — Su agar-glucosato, presente **solfato ammonico**, cellule ameboidi frequenti, fortemente vacuolizzate, prive di gocce oleose (3 delle fig.); presente **nitrato potassico** cellule come sopra, pure vaccuolizzate, ma assai ricchi di gocce di grasso (4 della fig.).

L'aspetto ameboide delle cellule dei lieviti non è nuovo, ma neppure ci risulta frequentemente segnalato. Lo troviamo descritto in Guilliermond e Tanner per *Zygosaccharomyces Bailii* (Lindner) Guill. e relazionato a fatti sessuali: ...„In this manner very peculiarly shaped cells are secured which look like amoebae. Without much doubt Lindner observed analogous forms in the pellicle of cultures of *Sacch. Bailii*. The forms of copulation in this yeast. The amoebiod celles represent, then unsuccessful copulation."

Successivamente formazioni ameboidee furono descritte e figurate da KRUMBHOLZ per una specie osmofila, distinta come nuova e denominata *Zygosaccharomyces ameboideus*. Anche qui, tali formazioni, sono in evidente rapporto ai fenomeni copulativi che accompagnano la formazione dell'asco. Finalmente pari formazioni ameboidee, le troviamo segnalate da SACCHETTI per una nuova varietà (v. *casei)* di *Sacc. Mangini*. SACCHETTI le ha repertate in vecchie colture su malto-agar e, pur notando una certa somiglianza morfologica con quelle descritte da KRUMBHOLZ, esclude siano in rapporto ai processi di sporulazione.

In *Candida pulcherrima* questo aspetto ameboide delle cellule non era stato, par quanto ci consta, segnalato. Nè crediamo che nel quadro da noi descritto rientrimo certe formazioni repertabili in un ceppo di *C. p.* isolotó da MRAK e MC CLUNG e da loro descritto come *Asporomyces uvae*. Noi abbiamo seguito, per un certo tempo e in vari substrati, la morfologia del ceppo di MRAK (che, nel fra tempo, abbiamo avuto cura di procurarci), ma non abbiamo mai osservato nulla che potesse paragonarsi alle formazioni sopra descritte per il nostro ceppo.

Quale significato e, in conseguenza, quale valore sistematico, deve eventualmente attribuirsi a questo nuovo aspetto morfologico di *Candida pulcherrima?*

Senza dubbio, se i processi sporologici segnalati da WINDISCH e le sue suggestive conclusioni fossero ampiamente dimostrate e generalmente accettate, non si potrebbe escludere a priori, in analogia a quanto si verifica nei ricordati *Zygosaccharomyces*, che esse precedessero o accompagnassero fatti di ordine sporologico. Senonchè mentre le osservazioni di WINDISCH attendono conferma, e a parte il fatto che lo stesso WINDISCH non ha mai osservato o per le meno descritto formazioni del genere, il mdo con cui esse insorgono nel nostro ceppo e si evolvono, lascia piuttosto pensare altrimenti. E noi siamo tentati di ammettere che si tratti semplicimente di una fase che prelude la formazione di pseudomicelio, quale si rinviene in quei ceppi dove i processi dissociativi si trovano ampiamente manifestati.

Vari aspetti morfologici in **Candida pulcherrima** (Lindner) Windisch

Spiegazione nel testo

Se così fosse, noi non potremmo allora attribuire nessun particolare valore sistematico a questa forma ameboide delle cellule, che pensiamo di considerare coma una semplice fase, fase che occuperebbe un posto intermedio tra quella non filamentosa tipo *Torulopsis* e quella filamentosa tipo *Candida.* [1])

Sommario:

Gli AA. descriono in uno stipite di *C. pulcherrima* (Lindner) Windisch degli aspetti ameboidi delle blastospore. Ritengono che questi aspetti più che preludere a processi sporologici, precedano forse la formazione di pseudomicelio; per questo essi aspetti ameboidi non hanno alcun particolare valore sistematico in quanto da ditenersi una fase che occuperebbe un posto intermedio tra quella non filamentosa tipo *Torulopsis* e quella filamentosa tipo *Candida.*

Summary:

O. Verona and G. Florenzano —
About some morphological appearances of *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch.

The AA. describe in a strain of *C. pulcherrima* (Lindner) Windisch, some amoeboid appearances of blastospores. They think these figures to be, more than the introduction to sporologic processes, the preamble to the formation of pseudomycelium; for this reason these amoeboid figures have no peculiar systematic value, as they are to be considered as a stage likely placed between the non-filamentous one of the *Torulopsis* type, and the filamentous one of the *Candida* type.

[1]) Accettando questo punto di vista diremo per inciso come lo stesso **Zygosacch. ameboideus** di Krumbholz sia probabilmente da riportarsi a **Zygosacch. polymorphus** Kr. et Kz., attesa la simiglianza degli altri caratteri.

Granulomatous Moniliasis resembling Blastomycosis (Cilchrist's Disease)

by

MORRIS MOORE, PH. D.

(From the Laboratory for Mycology of the Department of Dermatology of the Barnard Free Skin and Cancer Hospital, St. Louis, Missouri, U.S.A.)

(with 3 plates)

(16. 4. 1948)

Introduction

Moniliasis of the localized type affecting the skin, nails or mucous membranes is not an uncommon disease process. Generalized moniliasis involving the skin and the internal organs is met with infrequently. The rarest lesion produced by *Monilia (Candida) albicans* is that resulting in a granulomatous response of the tissue. Lesions of the latter type may so mimic the cutaneous manifestations of the verrucous type of tuberculosis, syphilis, pyogenic granulomas and other mycotic granulomas particularly blastomycosis, that clinicians may easily be misled in their diagnosis.

The reports in the literature on deep, cutaneous moniliasis have been very few. A number of reports in the European literature have been proven to be blastomycosis of the Busse-Buschke type. In 1928, PELS, IRMGAARD and SALINGER [1] described a granulomatous lesion in a seven year old child. BLACK and EDDY [2] in 1937 published a report of a case with nodular lesions of the face and subcutaneous, myxomatous tumors of the wrist and forearm from which they reported the isolation of a MONILIA. JONQUIÈRES [3] in 1940 diagnosed a tumor-like growth in the perianal region as cutaneous blastomycosis with a questionable monilial etiology. CAROL [4] in 1940 described an interesting case of deep and generalized moniliasis with two irregular, arcuate, verrucous growths on the right upper arm, of approximately four years duration, two years after a primary lesion had developed on the left shoulder. The lesions, clinically, were diagnosed as lupus vulgaris. *M. albicans* was isolated in culture and was observed in seceions of tissue. An unusually interesting report is that of DANBOLT [5] from Oslo who described multiple, rapidle progressing deep cutaneous lesions of moniliasis in a 78 year old man. The clinical picture was that of „American blastomycosis" without oral or systemic involvement.

Undoubtedly, there have been other reports of granulomatous moniliasis in the literature which have not come to my attention. The apparent paucity of published cases of this clinical form of the disease may be a result of misdiagnosis, without confirmatory laboratory procedures, or what seems most likely, that it is actually an unusual and rare occurrence. In either respect it is felt that the following case is worthy of reporting since it presented clinical features which were both confusing and misleading, resulting in a diagnosis of blastomycosis in spite of repeated

cultures of *M. albicans*. Only after careful examination of numerous sections of tissue, stained by various technics, were organisms found.

Report of a case

History. — O. G., a white man, aged 56, a married Missouri farmer, presented himself on May 22, 1944 at the dermatology clinic of the Barnard Free Skin and Cancer Hospital complaining of a „sore" on the back of the left hand of about six months duration. The hand had been injured on a barbed wire fence and the resultant ulcer failed to heal in spite of the use of topical ointments and „drops" by mouth, prescribed by local physicians. The involved skin was painful and the lesion continued to increase in size.

The family history was non-contributory. His marital history was likewise non-informative. There was no history of syphilis or gonorrhea either by name or by symptoms. The patient had had the usual childhood diseases without complications and had not had any operations or serious accidents.

Physical Examinations. — The patient appeared to be a well developed, well nourished, alert and cooperative man of medium height and about the stated age of 56 years. A general physical examination revealed no unusual abnormalities except for a lesion on the skin of the left hand. Over the dorsum of the left hand was a granulomatous lesion measuring approximately 7.5 by 9 cm. in diameter (fig. 1 : 1). At the periphery of the lesion there was an elevated, thickened border, deep reddish-purple in color. The base of the lesion was filled with grayish-red granulation tissue. On exerting pressure, many small beads of pus could be expressed from small abscesses on the border and in the base of the infected area.

The patient weighed 143 pounds (65 Kg.). The blood pressure was 118 systolic and 82 diastolic. The pulse rate was 74 and the respiration rate 20. The clinical impression was blastomycoss or pyogenic infection.

Cultures and smears were made from the pus expressed from the small abscesses. An ellipse of skin was removed from the lesion for biopsy. Blood was drawn for the Kahn reaction. The patient was scheduled for admission to the hospital on May 30, 1944.

Laboratory Examinations. — Urinalyses were normal. Kahn reactions of the blood were negative. The blood showed 5,700,000 red blood cells, 9,750 white blood cells and 90 per cent hemoglobin. These values changed during the patient's stay in the hospital with the red blood cells dropping to 4,760,000 and then rising to 4,820,000. The white blood cells slowly dropped to 5,350 three months later. The hemoglobin dropped to 89 per cent and then remained fairly constant. There were 66 polymorphonuclear neutrophils, 30 lymphocytes, 2 stabs, 2 mononuclears and no eosinophils or basophils per 100 white blood cells. These cell counts varied slightly. Smears made when the patient was first seen in the clinic did not reveel fungi. Cultures developed both **Staphylococcus aureus** and a yestlike organism identified as a strain of **Monilia (Candida) albicans.** Subsekuent cultures made on June 23 and October 2, 1944 developed similar colonies of the yeastlike organism. One smear of the pus made at a later date showed a few budding yeastlike cells when stained with one per cent aqueous methylene blue.

A roentgenogram of the thorax revealed normal lung findings. There was no evidence of tuberculosis or of a fungous infection. There was a diffuse aortic dilatation with perhaps beginning sacculation. On the basis of the roentgenographic observations, a Kline test was made and this gave a one plus reaction.

Microscopic examination of tissue excised on three occasions, May 22, June 1, and June 26, 1944 revealed non-specific granulomatous changes. No organisms were found in sections stained with hematoxylin and eosin.

Course and Treatment. — The patient's course was afebrile, with no complaints except a dull pain in the hand. Because of the culturing of S. aureus and M. albicans, treatment was begun using hot aluminum acetate soaks followed by four per cent xeroform (bismuth tribromphenate) in white petrolatum. There was slight improvement in the lesion. A week later, roentgen therapy was advised, 100 r through three ports (one proximal and two lateral), 0.25 half value layer, 200 k. v., 18 m. a., with a focal skin distance of 50 cm. There was some improvement following this therapy.

On June 9, 1944 the patient was given mixed treatment (mercury gr. X and potassium iodide gr. 0.1) by mouth, one teaspoonful, three times a day, based on the interpretation of the chest plate. There appeared to be some regression of the lesion a few days following the institution of this therapy but the periphery of the infected area continued to spread with new pustules. This treatment was continued for a total of 19 days. On June 29, 1944 sulfadiazine therapy was begun with 6 gm. (90 gr.) daily. A blood level of 8.1 mgm. per cent was obtained. This drug was continued for one week with no perceptible improvement.

On July 6, 1944 potassium permanganate (1 : 4,000) soaks, twice a day, were begun followed by painting of the infected area with gentian violet (one per cent aqueous solution). The hand improved steadily with this treatment and the base of the lesion was gradually replaced by scar tissue. Unfortunately, however, the border of the lesion continued to spread. On July 18, 1944 the patient was discharged from the hospital.

The patient returned August 15, 1944 to reenter the hospital. In the interim he had been soaking his hand in potassium permanganate solution (1 : 4,000) followed by the topical application of four per cent xeroform. The patient could move his hand more freely. There were fewer bleeding points and the lesion appeared flatter except for the raised proximal border. The distal border showed some clearing. There was some extension, however, to the ventral side of the hand. Improvement continued slowly until September 4. 1944 and then stopped. On September 9, 1944 a second treatment with Roentgen rays was given (100 r through three ports, 85 k. v., 5 m. a., 0.8 mm. aluminum filter). There was no change in the appearance of the lesion.

On September 18, 1944 he was started on penicillin, 10,000 Oxford Units, intramuscularly, every three hours with a total of 100,000 Units. This amount was again given on September 24, 1944. There was no apparent change, consequently on September 29, 1944 the potassium permanganate soaks and the painting with gentian violet was again started. A third culture was made on October 2, 1944 and **M. albicans** was again cultured. Potassium iodide (saturated solution) 15 drops, three times a day, orally, was begun. The dose was increased one drop per dose daily (three drops total daily increment). A third treatment with Roentgen rays was given on October 19, 1944 (100 r, through three ports). The lesion remained with little change and the patient continued on oral potassium iodide to the point of tolerance (fig. 1 : 2).

On November 15, 1944 he was exhibited as one of a number of patients before the section on Dermatology of the Southern Medical Assiciation. The general impression of the visiting dermatologists was that the lesion, clinically, was blastomycosis. On November 17, 1944 the patient asked to be discharged from the hospital in order to visit a sick sister. He has failed to return to the hospital for further therapy.

Pathology

Cutaneous moniliasis manifests itself in the form of vesicles, pustules, occasionally bullae, with crusting, scaling and deeply inflamed, red, thickened, moist lesions either isolated or in plaques. Microscopically, such lesions reveal an epidermis with hyperkeratosis, moderate to intense acanthosis, with vesicle formation. Vesicles may be peeled off exposing a bright red base, the dermis. In the dermis there is an inflammatory response with an infiltrate composed of epithelioid cells, leukocytes, fibroblasts and giant cells either arranged in tuberculoid fashion or forming abscesses of varying sizes.

The case presented here showed macroscopically a granulomatous lesion which was raised, thickened, somewhat verrucous and ulcerous. The border of the infected area was elevated, greatly thickened and deep reddish-purple in color. The base of this area was filled with grayish-red granulation tissue. On pressure, small beads of pus could be expressed from the thickened areas, from the base, but especially from the border.

This suggested microabscesses, the whole resembling primary, verrucous or ulcerous cutaneous blastomycosis.

Microscopically, sections of tissue taken for biopsy revealed an intensely hyperkeratotic epidermis with small areas of parakeratosis. The rete mucosum was extremely hyperplastic (acanthotic) with pseudoepitheliomatous proliferations or down-growths which varied greatly in size and shape (fig. 2 : 1; fig. 3 : 1—3). In the dermis there was a dense cellular infiltrate made up principally of polymorphonuclear leukocytes, many of these cells forming microabscesses. In fewer number were lymphocytes and epithelioid cells. In some areas there were large numbers of plasma cells. There were a few giant cells of the Langhans' type in the dermis and these could be seen arranged in tuberculoid fashion (fig. 3 : 3—4). The blood vessels and the lymph spaces were widely dilated. Small areas of hemorrhage were scattered among the cells of the infiltrate. A search for the organism of this disease, however, in the hematoxylin and eosin stained sections was not fruitful. The pathologist's report was non-specific granuloma.

In an attempt to demonstrate fungi in tissue, specimens of skin removed from the lesion were planted in Sabouraud's broth for three days. The tissue was then removed from the broth, fixed in Bouin's fluid and sections prepared by the usual laboratory procedures. The epidermis showed the characteristic hyperkeratosis and acanthosis. The epidermis was separated from the dermis due perhaps to the incubation in the broth.

In the dermis there was a dense cellular infiltrate made up chiefly of lymphocytes and large numbers of mast cells, some epithelioid cells, plasma cells and polymorphonuclear leukocytes. Fungi were not found in the hematoxylin and eosin stained sections. The diagnosis was considered to be non-specific granuloma.

Several sections of tissue were stained by the Gram-Weigert method and with methylene blue and eosin in an attempt to demonstrate fungi. A routine microscopic examination of the specially stained tissue proved unsuccessful for fungi. Because of the culturing of the same species of fungus on three different occasions, however, is was felt that the lesion should be mycotic. Consequently, periodic examinations of the slides were made. Finally. in December, 1946 a very characteristic yeastlike cell was found in a section of tissue stained with methylene blue and eosin (fig. 2 : 2). The organism was seen as a light blue budding cell in a histiocyte. A review of the hematoxylin and eosin stained sections finally revealed lightly staining yeastlike cells (fig. 2 : 3). The relative rarity of the fungi in tissue is difficult to explain, however, it is felt that the combined evidence of the cultures, histopathologic characteristics and the budding cells in tissue was sufficient to finally make a diagnosis of a yeastlike infection, moniliasis.

Mycology

The fungus isolated on three different occasions from the lesion of the patient described here was characteristic of *Monilia (Candida) albicans*. A description of the yeastlike organism in culture would be a repetition of characteristics so well and so often reported in the literature. Of chief interest is the appearance of the pathogenic cells in tissue.

The fungus was extremely difficult to find in tissue. When finally observed, the organism was seen as a yeastlike, ovoid budding cell stained with methylene blue. It was located in a macrophage. In hematoxylin and

eosin stained sections, the fungus was found in macrophages as a simple or budding organism with a clear, non-staining periphery, the cell wall, and an opaque, lightly staining cytoplasm.

Animal Inoculations

A nine day old subculture growing on Sabouraud's glucose agar was suspended in sterile physiologic saline. A dose of 0.5 cc. of the suspension was injected intraperitoneally into each of several mice. One mouse died two days later, one died three days after the injection and one animal lived for 16 days. Postmortem examination of the mice dead after two and three days revealed tubercle-like, cream-colored nodules on the intestines, pancreas, kidneys, spleen and liver (fig. 4 : 3). On cut section, the liver and kidneys showed deep nodules, grayish-yellow in color. Examination of the mouse that died 16 days following the inoculation revealed a greater number of nodules on the viscera and masses of adhesions. On cut section there were numerous nodules deep in the various organs.

A microscopic examination of the affected organs showed that the nodules were made up of inflammatory cells and masses of growing organisms, ovoid cells and short filaments, some cells on the surface and filaments and cells extending into the involved organs with invasion most noticeable in the 16 day mouse. In the medulla of the kidneys of the two and three day mice, the organisms were seen in abscess-like clumps, consisting chiefly of cells and short filaments (fig. 4 . 1—2). The cellular reaction was almost negligible, consisting only of a few inflammatory cells which were sparsely located around the nodule. In the livers of these mice the nodules were small, being pin-point to pin-head in size, with. a few somewhat larger. Microscopically, these nodules wer made up of liver cells which had lost their architecture and staining qualities, appearing somewhat like granulation tissue and scattered through this tissue were islets of actively growing fungous cells (fig. 4 : 4).

Microscopic observation of the tissue from the 16 day mouse showed that the nodules in the organs were large abscesses (fig. 4 :5). The periphery consisted of granulation tissue which encircled an area made up of necrotic tissue showing numerous nuclear and cellular fragments and apparently liquefaction. Scattered throughout the zone of liquefaction necrosis there were many budding, yeastlike organisms which stained faintly with eosin in the hematoxylin and eosin stained sections. The fungi stained intensely with the Gram-Weigert method.

The fungus was recovered in culture from the animals.

Discussion

The case presented here has a number of characteristics which make it unusual for a moniliasis. In the first place, the similarity of the lesion, clinically, to GILCHRIST's disease, is of sufficient interest to warrant the attention of dermatologists. The verrucous, erythematous, raised border with the numerous small abscesses make a diagnosis of blastomycosis tenable or at least suggestive from a clinical standpoint. In this regard, it is of interest also that the case described by Danbolt likewise suggested blastomycosis because of similar clinical observations. The illustration of the lesion in CAROL's paper, although diagnosed clinically as lupus vulgaris, could likewise have been mistaken for blastomycosis.

From the histopathologic standpoint, tissue from this case is of inte-

rest. The intense acanthosis developing pseudoepitheliomatous proliferation is not common with cutaneous moniliasis. This was also described by CAROL as occurring in the vegetative areas of the lesions of his case. The infiltrate was fairly characteristic of a chronic inflammatory reaction with lymphocytes, plasma cells, various leukocytes, chiefly polymorphonuclear in nature, and giant cells of the LANGHANS' or foreign body type. Abscesses varying in size could be found in the cutis and this was true of the case described by ROCKWOOD and GREENWOOD in addition to those of CAROL and of DANBOLT.

Of particular interest is the organism in this case. The scarcity of the fungous cells in tissue is unusual for most mycoses. In spite of the intense reaction of the tissue and the numerous abscesses, the number of organisms was comparatively rare. This was also observed by CAROL. It is possible that these cells may have been missed because of the need for specific stains as indicated in this case. In the second place, filaments of the fungus such as illustrated by ROSKWOOD and GREENWOOD were lacking in this case and also in both the cases of CAROL and DANBOLT. One may speculate on this phenomenon and venture the possibility that the fungi in these cases were highly virulent and actively proliferating in a very fertile soil.

A phenomenon unusual in moniliasis is the presence of active endothelial histiocytes. The organisms seen in the tissue were all within these cells. In addition, such histiocytes were found in abundance in various sections of the tissue engulfing leukocytic granules (fig. 3 : 2). A well known example of reticuloendothelial histiocytosis is found in histoplasmosis. In this disease, however, the histiocytes are more numerous and they engulf large numbers of the ovoid cells of the fungus, *Histoplasma capsulatum.*

Finally, it is of interest that for the time the patient was under observation, he showed very little reaction to the various forms of therapy with the exception perhaps of a slight response to roentgenotherapy. This was the experience also of Danbolt.

Summary

A granulomatous lesion of the wrist caused by *Monilia (Candida) albicans* is presented. The case is unusual because of the following:

1. It resembled blastomycosis (GILCHRIST's disease) sufficiently to be so diagnosed by many dermatologists.
2. In spite of the fact that the organism was isolated on three occasions, the fungus was observed with difficulty in smears.
3. Microscopically, sections of tissue had many of the characteristics of blastomycosis. The typical blastomycetes were not seen.
4. Repeated examination of sections of tissue finally revealed a characteristic, budding organism in a histiocyte in a section stained with methylene blue and eosin. Faintly stained budding cells were found in hematoxylin and eosin stained sections, also in histiocytes.
5. The lesion responded with some scar formation but with peripheral extension in spite of the varied and continued treatment.

References

1. Pels, I. R., Irmgaard, D., and Salinger, R.: An unusual eruption due to an organism of the Monilia group. Arch. Dermat. & Syph. 14 : 280 (Sept.) 1928.

2. Black, S. H., and Eddy, B. E.: Human infection with Monilia. Report of a

case with cultural data. J. Lab. & Clin. Med. 22 : 584 (Nov.) 1937.

3. Jonquières, E. J.: Blastomicosis cutanea (Monilia?). Rev. Assoc. Med. Argentina 54 : 809 (Aug. 15—20) 1940.

4. Carol, W. L. L.: Dermatomycosis profunda s generalisata, verursacht von Candida albicans. Acta dermat.-venereol. 21 : 70 (Feb.) 1940.

5. Danbolt, N.: Deep cutaneous moniliasis, a fatal case of a peculiar type. Acta dermat.-venereol. 21 : 98 (Feb.) 1940.

6. Rockwood, E. M., and Greenwood, A. M.: Monilial infection of the skin. Report of a fatal case. Arch. Dermat. & Syph. 29 : 574 (April) 1934.

Explanations of Figures

Tab. 1: Granulomatous, cutaneous moniliasis of back of hand and wrist. 1. Lesion photographed on June 8, 1944; 2. Lesion photographed on November 15, 1944.

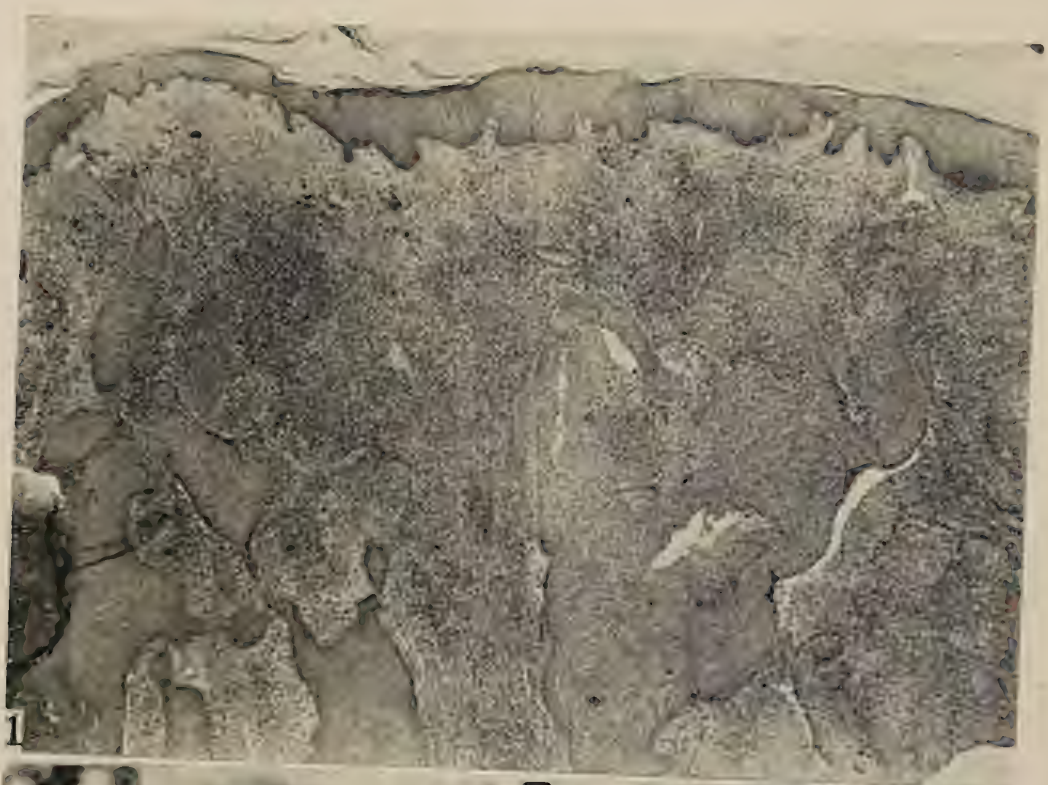
Tab. 2: 1. Section through lesion. Note extensive pseudoepitheliomatous proliferation in dermis and extensive infiltrate. H. & E. X 65; 2. Simple budding cell of Monilia (Candida) albicans within histiocyte as seen in dermis. Methylene blue and eosin stain. X 2635; 3. Several cells of M. albicans in histiocyte. H. & E. X 1345.

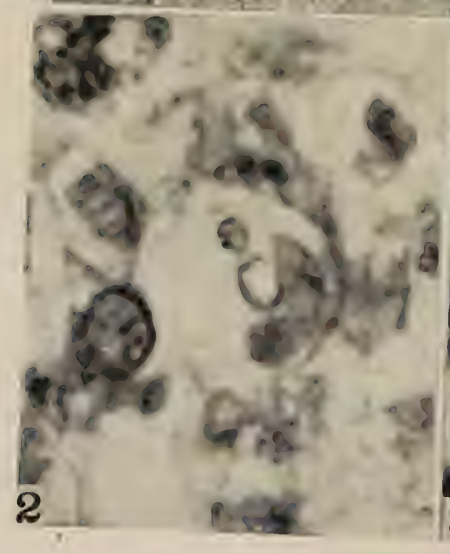
Tab. 3 1. Section through lesion showing hyperplastic epidermis within which is present an abscess-like structure. H. & E. X 135; 2. Section through dermis illustrating the active phagocytosis. H. & E. X 1380; 3. Section through lesion illustrating the pseudotuberculous process in dermis. H. & E. X 135; 4. High power photomicrograph of lesion seen in preceding photograph showing the giant cells and the infiltrate consisting of epithelioid cells and polymorphonuclear leukocytes. H. & E. X 600.

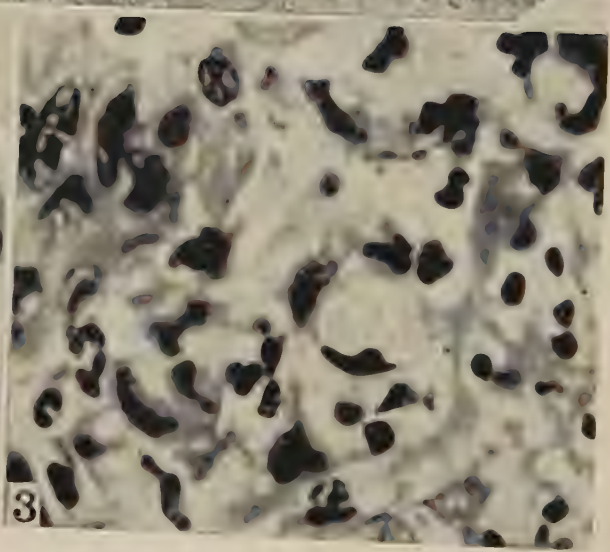
Tab. 4: Experimentally induced lesions in mice. 1. Section through kidney of mouse, three days after inoculation, showing extensive invasion of tissue with little reaction. H. & E. X 100; 2. Section through mouse kidney, two days after inoculation, showing simple and budding cells of M. albicans. H. & E. X 2700; 3. Section through spleen of mouse two days after inoculation. Note nodule on splenic capsule. H. & E. X 205; 4. Section through mouse liver two days after inoculation. Note nodule. H. & E. X 225; 5. Section through mouse kidney, 16 days after inoculation, illustrating abscess-like formation. Organisms are scattered throughout this lesion. H. & E. X 195.

Tab. 1

Morris Moore

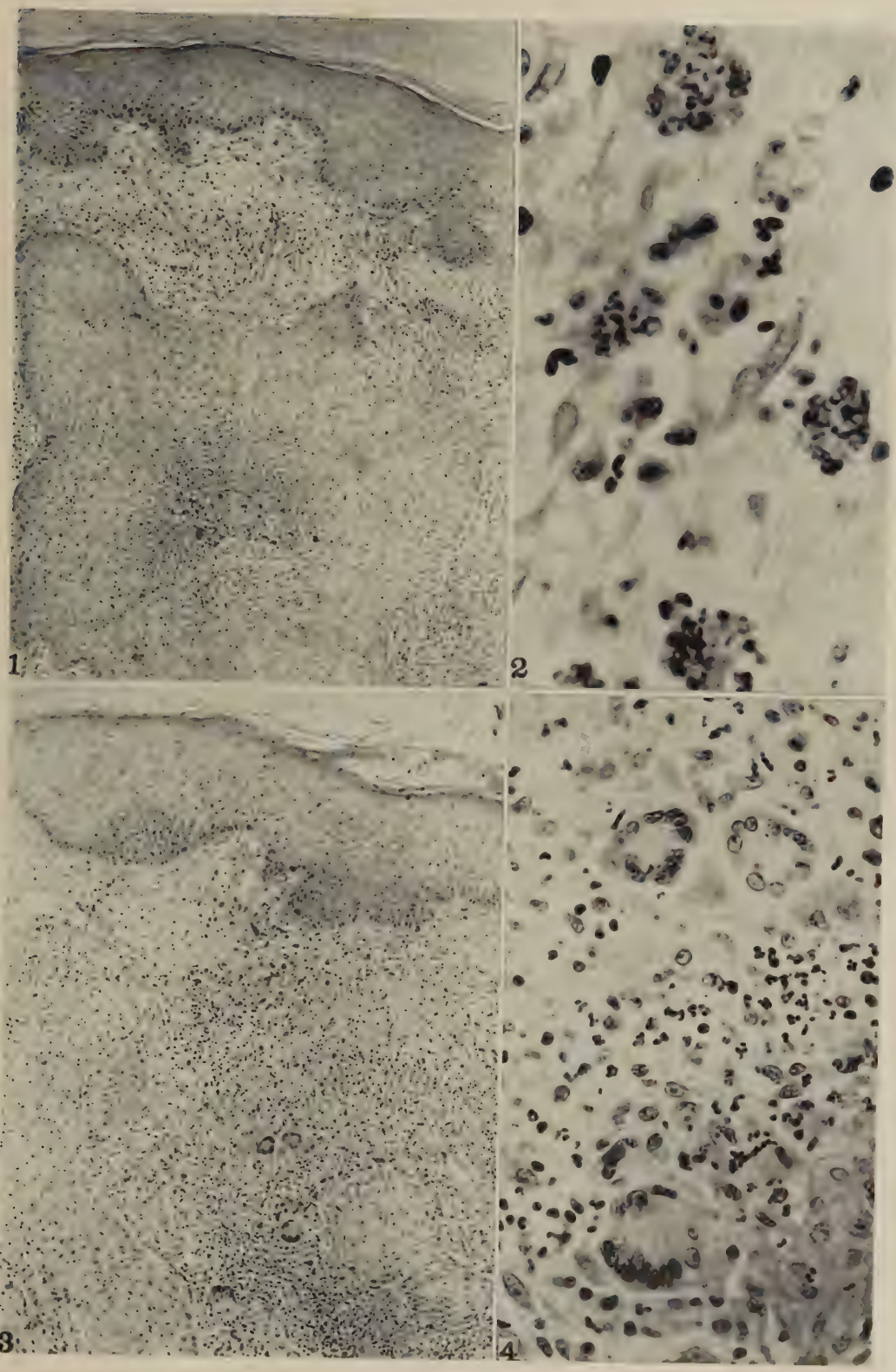






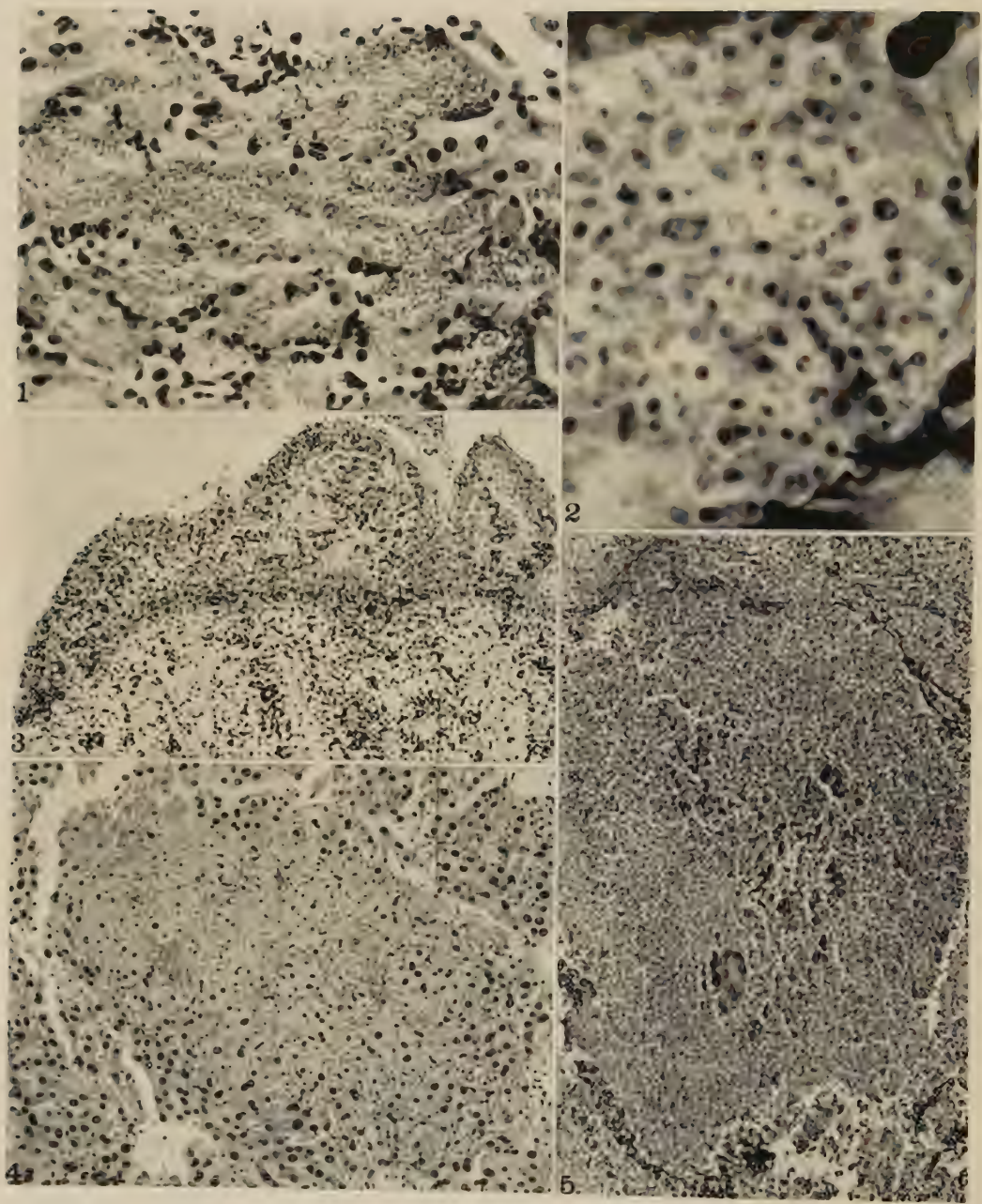
Morris Moore

Tab. 2



Tab. 3

Morris Moore



Tab. 4

Morris Moore

Interaction between pathogenic fungi in culture. Considerations on the mechanism of cell division in the dimorphism of pathogenic fungi

by

WALTER J. NICKERSON [1]) and OTIS F. JILLSON [2])

(Tufts College Medical School, Boston, Mass., U.S.A.)

(with 1 plate)

(17. 4. 1948)

The rarity of mixed fungus infections of the skin and nails has been commented on by MUSKATBLIT (1941, '46) and by LEWIS and HOPPER (1939); our own clinical experience serves to confirm these observations. It was with these clinical observations in mind that we planned a series of experiments on two-membered pure cultures of pathogenic fungi, and on the effects of culture filtrates from pathogenic fungi grown in pure culture on the growth of other pathogenic fungi. These experiments have thrown some interesting light on the phenomenon of yeast to mycelia conversion in *Candida albicans* and furnished evidence that the pigment of *Trichophyton rubrum*, „in vivo", is subject to the influence of the pH of the environment. This work has been described in part by JILLSON and NICKERSON *(1948);* the present paper provides additional data on the above findings and presents evidence that yeast to mycelia conversions result from the suppression of enzymatic processes involved in cell divison.

Pigmentation and growth of Trichophyton rubrum

Using freshly isolated strains of *T. rubrum.* and *C. albicans,* two-membered cultures were prepared on corn meal agar slants. As will be noticed in Figure I the organisms grown singly in pure culture present a typical appearance; when, however, the organisms are grown together the pigment of a mature culture of *T. rubrum* is no longer wine-red but a burnt orange color. It is well known from the work of Tate (1929) that the pigment system of many of the dermatophytes can be extracted and that the extracted pigment can function as a pH indicator. NICKERSON (1947) has compared data on the physical and chemical properties of dermatophyte pigments and concluded that only one pigment system may be involved in the dermatophytes. It is clear from experiments as typified by Figure I that the pigment system of *T. rubrum* may be influenced by the external pH of the environment, and that the pigment is a pH indicator „in vivo" as well as „in vitro". We have also grown *T. rubrum* in pure culture on media buffered at different pH values and obtained a graded color series from burnt orange (acid) to wine red (alkaline).

1. John Simon Guggenheim Memorial Fellow; present address: Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hoogeschool, Delft, Holland.

2. Present address: Dept. of Dermatology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York.

From a study of the respiratory metabolism of three dermatophytes, NICKERSON and CHADWICK (1946) had found that the respiratory enzyme systems of *T. rubrum* (in contrast to those of *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton gypseum)* were not easily affected by the pH or salt content of the environment of the cells. They reached the conclusion that the respiratory enzymes of *T. rubrum* were either located well within the cell interior (not near the surface boundary) or were of a different nature from those of the other two species. On the basis of the present experiments it would seem that the latter choice may be favored. Of course, in the experiments on respiration there was no growth, since the measurements were conducted in on-nutrient media, while in the experiments reported here the „in vivo" color changes occurred during growth.

An inhibition of growth is also apparent in the two-membered culture in Figure I. It was found that sterile filtrates from cultures of *C. albicans* grown on a glucose, glycine, yeast extract medium were able to inhibit the growth of *T. rubrum.* The results of quantitative experiments with these filtrates will be reported at a later date.

Yeast to mycelia conversions

It is convenient to adopt a few abbreviations in connection with the discussion of the phenomenon of yeast (Y) to mycelia (M) conversions. For this purpose we propose to use the symbols Y→M to indicate such a conversion. It will similarly be understood that $Y \rightleftarrows M$ represents a reversible interconversion of a yeast to and from a mycelial form. In Figure I it is clear that mycelia production by *C. albicans* is completely inhibited by the presence of *T. rubrum.* As reported in detail by JILLSON and NICKERSON (1948) sterile filtrates of *T. rubrum* grown in malt extract broth possessed a very considerable ability to inhibit the development of mycelia by *C. albicans.* However, these filtrates had little effect on the growth in the Y phase. After preliminary experiments on the chemical fractionation of the *T. rubrum* filtrates it was found that the inhibition of Y→M resulted from the presence in the filtrates of two diffusible metabolic products of *T. rubrum* of which, 1) was soluble in water and acetone, heat stable, adsorbed by activated charcoal, and eluted therefrom by aqueous-acid alcohol, while 2) was water soluble, acetone insoluble, heat labile, and not adsorbed by activated charcoal. Further purification experiments are in progress.

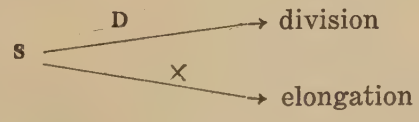
Various chemical agents, that might conceivably result from the growth of *T. rubrum,* have been investigated, for action on Y→M. The production of NH_3 and the accompanying increase in alkalinity are well known results of the growth of many dermatophytes; however, pH (4.5—8.0) had no effect, and NH_4^+ ions affected Y→ M only at high concentration (3 %).

The phenomenon of $Y \rightleftarrows M$ in yeasts is not confined to *Candida* and may be observed in several other genera. JILLSON and NICKERSON (1948) have presented a general discussion of the occurrence of Y→M and $Y \rightleftarrows M$ together with considerations of the mechanisms that may be operating at the intracellular level in these processes. It is clear that a close analogy exists between these processes and those in bacteria which have been induced to elongate without undergoing cell division. The work of HINSHELWOOD (1946) and coworkers has done much to provide a rational basis for understanding the mechanisms involved. Bacteria (B) may be induced to elongate into filaments (F) by a variety of substances and

conditions including basic dyes, m-cresol, changes in nitrogen source, osmotic pressure and irradiation. Hinshelwood has found proflavine among the most effective agents in accomplishing B→F. From a careful analysis of numerous experiments he has concluded that the maintenance of normal cell size and shape in bacterial cultures is the result of a balance between two factors — a division (D) factor, and an elongation (L) factor. These two factors may become unbalanced and result in a cessation of growth or in the production of elongated cells. Recent experiments of NICKERSON and BILLE—HANSEN (1948) on yeasts have shown that proflavine (3,6 diamino-acridine) is also a very effective agent for inducing Y→M, even in yeasts that do not normally exhibit such phenomena.

With the use of various chemical substances as division (D factor) inhibitors, it is possible to convert a large fraction of the cells of a population to the M or F form; this more or less precludes the operation of mutational or survival-selection mechanisms, especially since M or F may later be changed by to Y or B by incubation in appropriate media. A possible conclusion is that the D factor is enzymatic and may be inhibited by the various agents, yet resume functioning when the inhibitors are removed. This concept is greatly strengthened by the results of x-ray studies on bacteria by WITKIN (1946), EISENSTARK and CLARK (1947), and others. Induction of irreversible B→F changes by irradiation have been obtained by these workers. Analyses of the x-ray dosage data indicate that a „one hit-one gene" mechanism is involved, indicating further that a single enzyme mechanism may be concerned with cell division; EISENSTARK and CLARK refer to a „pinching off" enzyme.

Still more support for the concept of a unitary enzymatic mechanism controlling cell division is furnished by the experiments of NICKERSON and EDWARDS (1948) on dimorphism (Y⇄M) in *Blastomyces dermatitides, B. brasiliensis,* and *Histoplasma capsulatum.* The effect of temperature on M⇄Y conversions in these forms is well known from the work of CIFERRI and REDAELLI (1935) and CONANT (1939). It has recently been shown by LEVINE and ORDAL (1946) for *B. dermatitidis,* confirmed by NICKERSON and EDWARDS and extended to B. *brasiliensis,* that M⇄Y will occur with these forms on an inorganic salts, glucose, ammonium sulfate medium at appropriate temperatures. Thus M⇄Y is here, apparently, only a function of temperature and independent of nutrition (thermal dimorphism). This favorable situation focusses attention on effects of temperature alone. A series of experiments on the respiration of these pathogenic fungi over a range of temperatures led NICKERSON and EDWARDS to conclude that, in the range 20—40°, two enzymatic precesses were limiting the rate of oxygen consumption. With increasing temperature, one of these (the reversible denaturation of a terminal enzymatic reaction) became more and more pronounced. This conclusion led to the



3. The detailed scheme proposed for the mechanism of action in the thermal dimorphism of **Blastomyces** is probably not completely applicable to other cases. However, it may have a fairly general significance since (s) may be equivalent to Hinshelwood's diffusible (L), elongation, factor.

concept that the effects of temperature on $M \rightleftarrows Y$ in *Blastomyces* may be interpreted by a closely comparable analysis.

If we assume that cell division and elongation result from slightly different actions on the same substrate (s), then, at room temperature, the competition beween the enzymes D(division) and X(leading to elongation) will be decided in favor of whichever enzyme has the higher affinity constant for the substrate. In view of the known facts we can believe that X has a much higher affinity for S than does D. Now, however, with increasing temperature X may be reversibly denatured so that D gets more of the substrate and division occurs. (3)

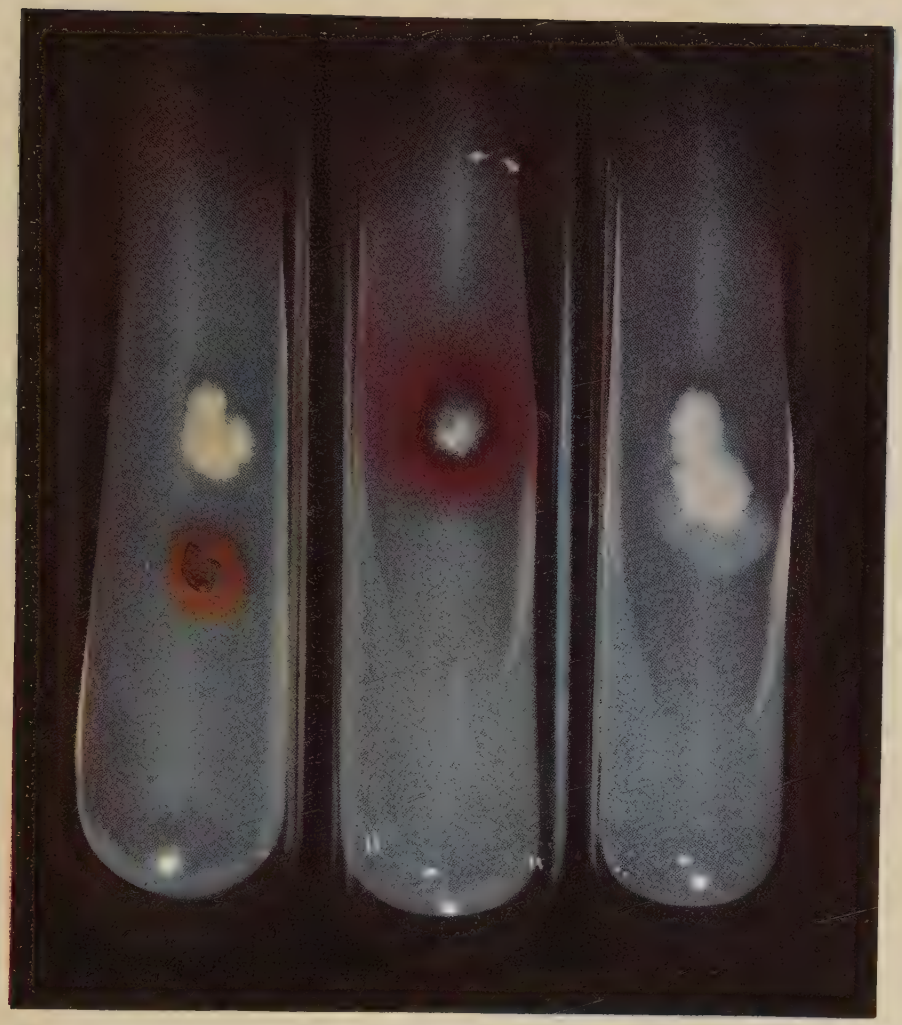
The recent review by PRATT and DUFRENOY (1948) on the mechanism of action of penicillin (which GARDNER, 1940, early showed caused susceptible bacteria to undergo B→ F at sub-bacteriocidal concentrations) implicates the attack of (—SH) bearing enzymes. Protection of sulfhydryl groups from dehydrogenation prevents B→ F. It is possible that it is such an action that our *T. rubrum* filtrates possess in preventing Y→ M in *C. albicans*. Experiments are in progress to test this hypothesis.

Summary

A mutual antagonism (in vitro) has been shown between *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* by means of two membered pure cultures and by means of cultures filtrates from each organism grown singly. The growth of *T. rubrum* was inhibited by metabolic products of *C. albicans*. The pigment of *T. rubrum* has been shown to be a pH indicator in vivo. Metabolic products of *T. rubrum* completely inhibit the development of mycelia by *C. albicans*, but have little effect on growth in the yeast phase. Chemical fractionation experiments indicated that there are two diffusible metabolic products of *T. rubrum* affecting mycelia development: 1) soluble in water and in acetone, heat stable, and adsorbed by activated charcoal, 2) soluble in water, insoluble in acetone, heat labile, and not adsorbed by activated charcoal. The general phenomenon of yeast to mycelia conversions has been considered in detail. A notation system has been developed in this connection; yeast (Y) to mycelia (M) transformations may be expressed as Y→ M; interconversions of the type exhibited by *Blastomyces* may be written $Y \rightarrow M$. The relationships between these processes and the analogous bacteria (B) to filament (F) conversions, B→ F, has been pointed out. Evidence that Y→ M, $Y \rightleftarrows M$, and B→ F may result from the inhibition of a common unit enzymatic mechanism has been presented. Converging evidence from such diverse fields as the physicochemical study of the kinetics of bacterial growth (HINSHELWOOD), genetics of irradiated bacteria (WITKIN; EISENSTARK and CLARK), cytochemical mechanism of penicillin action (PRATT and DUFRENOY), and dimorphism of pathogenic fungi (this paper; NICKERSON and EDWARDS) are all interpreted as pointing in this direction.

Legend for figure

Two-membered pure culture (right) of Candida albicans (white, upper) and Trichophyton rubrum (orange, lower). Single membered cultures of C. albicans (left) and T. rubrum (middle, wine-colored). Note the complete suppression of mycelia development in C. albicans in the two-membered culture; compare the coloration and extent of growth of T. rubrum (middle vs. right). Photographed by Mr. Frank White (Biological Laboratories, Harvard University) on Ektachrome film; photoflood spot light at butt of tubes.



Walter J. Nickerson
and
Otis F. Jillson

Bibliography

Ciferri, R. and Redaelli, P. 1935 Atti dell' Inst. Botan. dell'U. di Pavia **6** : 55
Conant, N. F., 1939 Proc. Sixth Pacific Cong. **5** : 853
Eisenstark, A. & Clark, G. L. 1947 Science **105** : 553
Gardner, A. D. 1940 Nature **146** : 837
Hinshelwood, C. N. 1946 The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell. University Press. Oxford
Jillson, O. F. and Nickerson, W. J. 1948 Mycologia **40**.
Levine, S. and Ordal, Z. J. 1946 J. Bact. **52** : 687
Lewis, G. M. & Hopper, M. E. 1939 Introduction to Medical Mycology. Year Book Pub., Chicago
Muskatblit, 1941 Arch. Dermatol. Syphilol. Chicago **44** : 631.
1946 ibid. **54**: 558.
Nickerson, W. J. 1947 in Biology of Pathogenic Fungi, (ed. Nickerson), Chronica Botanica, Waltham, Mass.
Nickerson, W. J. and Chadwick, J. B. 1946 Archives Biochem. **10** : 81
Nickerson, W. J. and Bille-Hansen, E. 1948 C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol., in press
Nickerson, W. J. and Edwards, G. A. 1948 Archives Biochem, in press.
Pratt, R. and Dufrenoy, J. 1948 Bact. Revs. **12** : 79
Tate, P. 1929 Biol. Revs. **4** : 41
Witkin, E. M. 1946 Proc. Nat. Acad. Sci. Washington **32** : 59

Bibliographia Mycopathologica

1946—47

ABRAHAMS J. a. MILLER J. K., The in vitro action of sulfanomides and penicillin on **Actinomyces.** J. Bact., **51,** (2), 145, 1946.

AGOSTINI A., Confronto clinico-patologico fra un caso di eritrodermia micosica ed un caso di prurito del tipo cosidetto „linfadenico". Acc. Fisiocr. di Siena, 30 giugno 1945.

ALBERT M., A note on a case of blastomycosis cured by sulphapyridine and sulphathiazole., Brit. J. Derm. Syph. **55,** (12), 294—296, 1943.

ALBERT W. B. and ZEIGLER R. F., A simple, effective treatment for epidermophytosis. Sth. med. J., 37, (6), 348—349, 1944.

ALFONSO J. M. et CANCELA FREIJO J., Histoplasmosis de Darling. Primera observacion efectuada en el Uruguay. Curacion clinica luego de tratamiento con sulfadiazina (nota preliminar). Arch. urug. Med., **24,** (3), 193—210, 1944. **(Histoplasma sapsulatum).**

ALMEIDA F., Study of blackgrain mycetoma due to Actinomyces paraguayensis. Mycopathologia, **3,** (3), 1940.

ALMEIDA F., Actinomicose de graos pretos. Folia Clinica et Biologica, **12,** (1), 1940.

ALMEIDA F., Consideraçoes em torno do gênero **Phialoconidiophora.** An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **17,** (2), 533—545, 10 fig., 1941.

ALMEIDA F., Notas micologicas. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **17,** (2), 547—559, 9 fig., 1941.

ALMEIDA F., Cons. sobre as micoses pulmonares. Conf. Sessao Tisiologia de Assoc. Paulista de Med. 1941.

ALMEIDA F., A blastomicose no Brasil e seus cogumelos. Arquivos de Biologia, Ano 26, Num. 250, 1942.

ALMEIDA F., Micoses bucais e vaginais. Sua relaçao com a gestaçao. Aula taquigrafada no Curso Especial do Prof. Briquet de 1942. Arquivos de Biologia, Ano 27. Num. 256, 1943.

ALMEIDA F., Micoses e sua importancia pratica. Fichario Medico terapeutico, aprile-giugno, 1945.

ALMEIDA F., Contribuçao para o estudo da morfologia do Coccidioides immitis nos tecidos parasitados. Rev. Sudamer. de Morfologia, 3 (1), 103—109. 11 fig., 1945.

ALMEIDA F. e ABDALLA R., Estudo micologico de algumas amostras brasileiras do gênero **Actinomyces.** An Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16,** (1), 281—285, 11 fig. 1940.

ALMEIDA F. et BARBOSA SIMOES F. A., Contribuçaô para o estudo de **Cephalosporium recifei.** Arquivos do Instituto Biologico, **11,** (1), 1940.

ALMEIDA F. et BARBOSA SIMOES F. A., Contribuçao para o estudo geral dos micetomas maduromicoticos observados no Brasil. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16,** (1), 235—246, 1940.

ALMEIDA F. et SIMOES BARBOSA F. A., Micetomas brasileiros. An. Fac. med. S. Paulo, 235, 1940.
(Madurella mycetomi, M. ramiroi, M. oswaldoj, Scedosporium apiospermum, Aspergillus, Cephalosporium, Acremonium, Candida, Indiella, Acremoniella lütziì).

ALMEIDA F. et BOLOGNANI FILHO H., Consideraçoes bacteriologicas sobre 50 casos de amigdalites. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **20,** 141—143, 1944.

ALMEIDA F. et FERNANDES M., Isolamento rapido do **Paracoccidioides brasiliensis.** An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **20,** 155—157, 1944.

ALMEIDA F., GOMES J. M. et SALLES C., Consideraçoes sobre uma amostrade **Chaetonium** isolada de uma lesao epidermica. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **20**, 145—154, 1944.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Nova para demonstraçao rapida dos acosporos. Folia Clinica et Biologica, **12**, (4), 1940.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Processos pulmonares mixtos com especial referencia à accociaçao tuberculo micòtica. An. Paul. Med. e Cir., 1940.

ALMEIDA F. e SILVA LACAZ C., Cogumelo do gênero **Saccharomyces** isolade do escarro. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16**, (1) 247—251, 1940.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Consideraçoes micologicas sobre 6 amostras de lêvedos isolados do escarro. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16** (1), 257—265, 1940.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Estudo micologico de um cogumelo do gênero **Hormodendrum** isolado acromia parasitaria. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16**, (1), 221—233, 9 fig., 1940.

ALMEIDA F. e SILVA LACAZ C., Cogumelo do gênero **Saccharomyces** isolado do graos vermelhos. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **16**, (1), 207—213, 1940.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Micose pelo **Cryptococcus neoformans** (Primero caso observado em Sao Paulo). Anais Paulistas de Med. e Cir., **42**, (5), 385—394, 1941.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Estudo sobre o **Actinomyces brasiliensis** (Lindenberg, 1909). An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **17**, (2), 577—583, 1941.

ALMEIDA F. e LACAZ C. S., Intradermo reaçao com Paracoccidioidina no diagnostico do granuloma paracoccidioidico. Folia Clinica et Biologica, **13**, (6), 177, 1941.

ALMEIDA F. e SILVA LACAZ C., Consideraçoes em torno de duas amostras de **Histoplasma** isoladas de dermatite verrucosa e de escarro. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **17**, (2), 561—575, 1941.

ALMEIDA F. et LACAZ C., Notas a proposito das blastomicoses propriamente ditas Revista de Medicina, **26**, (97), 27—37, 8 fig., 1942.

ALMEIDA F. et LACAZ S. C.. Micoses broncopulmonares. Companhia Melhoramentos S. Paulo, 98, 34 fig., 1942.

ALMEIDA F. et LACAZ C., Consideraçoes em torno de um cogumelo isolado de um caso de blastomice. Folia clin. biol. S. Paulo, **14**, (1), 25—32, 1942. (**Paracoccidioides grasiliensis, P. cerebriformis**).

ALMEIDA F. et LACAZ C., Consideraçoes sôbre a tricomicose nodular. Ann. paul. Med. Cirurg., **44**; (3), 250—251, 1942. (**Actinomyces tenuis**).

ALMEIDA F. et LACAZ C., Valor das intradermo-reaçoes no diagnostico das micoses. An. Fac. Med. S. Paulo, **18**, (1), 125—133, 1942.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Estudos sobre esporotricose no Brasil e mais particularmente em Sao Paulo (1º nota). Anais Faculdade Medicina Univ. S. Paulo, **19**, 129—136, 1943.

ALMEIDA F. et LACAZ C., Estudos sobre a „blastomicose brasileira". An. paul. Med. Cirurg., **45**, (6), 433—434, 1943. (**Paracoccidioides brasiliensis**).

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Nova contribuçao para o estudo dos ascas das leveduros. Anais Faculdade Medicina Univ. S. Paulo, **19**, 145—153, 1943.

ALMEIDA F. et LACAZ C., Levaduroses humanas. An. paul. Med. Cirurg., **45**, (5), 348—349, 1943.

ALMEIDA F. et SILVA LACAZ C., Notas sobre algumas questoes micologicas (Resposta ao Prof. Dr. O. da Fonseca, Filho). Arquivo de Biologia, Ano 28, Num. 261, 1944.

ALMEIDA F., LACAZ S. C. et et BARROS O., Leveduroses humanas. (Visao geral do assunto)., Rev. do Inst. Adolfo Lutz, **2**, (2), 1942.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C. et BARROS O., Flora micotica das fezes. Rev. do Inst. Adolfo Lutz. **3**, (2), 272—280, 1943.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C. et BARROS O., Flora micotica de fezes normais. Revista do Inst. Adolfo Lutz, **5**, (2), 337—341, 1945.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C. et CUNHA AD. CARDOSO, Intradermo-reaçao para o diagnostico da blastomicose sul- americana (granulomatose paracoccodioidica). Archivos Brasileiros de Medicina, **35**, (7—8), 267—272, 1945.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C. et CUNHA A. C., Dados estatisticos sôbre a gra-

nulomatose paracoccidioidica (blastomicose sul-americana ou paracoccidioidose). Revista Brasileira de Medicina, **3**, (2), 91—94, 1946.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C., et FORATTINI O. P., Açao da Sulfanilamida e seus derivados „in vitro" sôbre o **Paracoccidioides brasiliensis.** Resenha Clinico-cientifica, Ano XV, No. 3, 1946.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ, JUNQUEIRA L. C. et FIGUEIRA MELLO F., Consideraçoes sobre a sapralegniose. Anais Faculdade Medicina Univ. S. Paulo, **19**, 155—161, 1943.

ALMEIDA F., LACAZ C., et NETO C. F., Dados estatisticos sobre o granuloma paracoccidioidico no Brasil. Importancia de seu estudo. An. Fac. Med. S. Paulo, **18**, (1), 137—144, 1942.

ALMEIDA F., SILVA LACAZ C. et RIBEIRO DO VALE L. A., Flora micotica de algunos produtos alimentares. Rev. do Inst. Adolfo Lutz, **3**, (1), 148—155, 1943.

ALMEIDA F., LACAZ C. et SALLES M., Blastomicose do tipo Busse- Buschke (Granulomatose criptococica, torula infection, torulosis). Segundo caso observado em Sao Paulo. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, **20**, 115—131, 1944.

ALMEIDA F., RIBEIRO D. O., ASHCAR H., LACAZ C. et ALMEIDA PRADO SAMPAIO S., I — Açao da penicilina, „in vitro", sobre o **Paracoccidioides brasiliensis.** II — Resuldados obtidos com a administraçao dêsse antibiotico no tratamento da „blastomicose sul-americana". O Hospital, **29**, (1), 109—112, 1946.

ALMEIDA F., RIBEIRO DO VALLE L. A., SILVA LACAZ C. e CUNHA A. C., Contribuiçao para o estudo da flora do intestino delgado humano (consideraçoes sobre os primeiros 50 casos estudados). „O Hospittal", **26**, (6), 973—977, 1944.

ALMEIDA PRADO A., Blastomicose do pulmao e das capsulas suprarrenais. Sindromo de cardiaco negro. Rev. Assoc. med. argent., **58**, (542), 789—793, 1944.

ALVAREZ PUEYO J. et DE ARMAS V., Esporotricosis mixta, tipo Schencki-Beurmanni (primera observacion registrada en la casuistica micologica). An. Inst. Llorente, **1**, 25—31, 1943. **(Sporotrichum schencki, S. beurmanni.)**

ANDERSON K. W. a. SKINNER C. E., Jeasts in decomposing Flesch Fungi. Proc. of the North Central of the Soc. of to Amer. Bacteriol., 22 dec., 1946.

ANDERSON NINA A., SAGE Dorothy N. et SPAULDING E. H., Oral moniliasis in newborn infants. Arch. Dis. Childh., **67**, (6), 450—456, 1944. (Monilia albicans).

ANGELETTI A. e TAPPI G., Sulla biosintesi degli steroli ad opera di alcuni Penicilli. Ric. Sci. e Ricostruz., **17**, (1), 61, 1947.

ANGULO J. J., Efectos de las radiacione ultravioletas sobre la **Monilia albicans.** Inf. med., Habana, **7**, (1), 1—7, 1943.

ARAUZ S. L., STEINBERG I. R. and CARLONE M. J., Extensive blastomycosis originating in the soft palate and pulmonary tuberculoses. Sem. méd. B. Aires, **44**, 1576—1580, 1942.

AREA LEAO A. E., Consideraçoes sobre os Thallosporados. O genere **Trichosporon; Trichosporon minor** n. sp. produtor da piedra axilar., Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **35**, (4), 729—745, 1940.

AREA LEAO A. E., CURY A. et MELLO M. T., Cromoblastomicose experimental. Formaçao no pus e no tecido de graos com clavas. (nota previa). Brasil Med., **59**, (46—47), 3—6, 1945.

AREA LEAO A. E., CURY A. et FERREIRA FILHO J. M., „Tinea Nigra" („Keratomycosis Nigricans palmaris"): Observaçao e estudo de um caso. Rev. Brasil. Biol., **5**, (2), 165—177, 1945.

AREA LEAO A. E., CURY A. et MELLO M. T., Cromoblastomicose. Observaçao de um novo caso. Rev. Brasileira de Medicina, **4**, (9), 697—702, 1946.

AREA LEAO A. E. et GOTO M., Esporotricose. Observaçao e estudo de um novo caso. O. Hospital, 407—418, 1946.

AREA LEAO A. E., MELLO M. T. et MAYOR V., Acariones infestadores de culturas de cokumelos. Biologia, classificaçao, métodos de combate. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **42**, (3), 559—608, 1945.

ARGUELLES CASALS D., Cromoblastomicosis en Cuba. Med. lat., March—April, 19, 1943. **(Hormodendrum pedrosoi.)**

ARNOLD R. and WHILDIN J., Rhinosporidiosis of the conjunctiva. Case report. Amer. J. Ophthal., **25**, 1227—1230, 1942.

ARNSTEIN H. R. V. a. COOK A. H., The penicillin produced by **Aspergillus parasiticus.** Brith. J. exper. Pathology, **28,** (2), 94—97, 1947.

ARONSON J. D., SAYLOR R. M. and PARR E. I., Relationship of coccidioidomycosis to calcified pulmonary nodules. Arch. Path., **34,** 31—48, 1942.

ARTAGAVEYTIA—ALLENDE R., Las Monilias. Contribucion al estudio de la microbiologia buccal. Arch. urug. Med., **25,** (2), 148—165, 1944. **(Candida albicans).**

ASCHER L., Two cases of pulmonary blastomycosis in brothers. Harafuah, **27,** (7), 124—125, 1944.

ASHBURN L. L. and EMMONS C. W., Spontaneous coccidioidal granuloma in the lungs of wild rodents. Arch. Path., **34,** 791—800, 1942.

ASHBURN L. L. and EMMONS C. W., Experimental **Haplosporangium** infection. Archives of Pathology, **39,** 3—8, 1945.

ASTHANA R. P., Aspergillosis in fowis. Proc. Indian Acad. Sci., **20** (2), 43—47, 1944. **(Aspergillus fumigatus).**

ATTARDI G. e MARCONI L., Particolari attività antibiotiche di ceppi di **Penicillium** e **Aspergillus.** Ric. Sci. e Ricostruz., **16,** (12), 1775—1779 1946.

ATWOOD H. S., Actinomycosis of the lung. Northw. Med. Seattle, **41.** (12), 419—420, 1942. **(Actinomyces hominis).**

AYRES S. and NELSON P. A., So-called fungus infections of the hand. Calif. West. Med. **56,** (2), 63—65, 1942.

AZULAY R. D., Cromoblastomicose. Clinica e Laboratorio, Tése. Rio, 1944.

BABLET J., Note sur l'histoplasmose de Darling. Ann. Inst. Pasteur, **66,** (5), 397—403, 1941.

BAILA A. E., Actinomicosis cervico-facial. Nuevos observaciones de timolterapia. Dia Méd. B. Aires, **16,** (27), 706—707, 1944.

BAILA E. A. et MACCHI A. J., Actinomycose thoraco-pleuro-pulmonaire et penicilline. Rev. Asoc. Méd. Argent., **60,** (577—578), 151—154, 1946.

BAKER E. E., MRAK E. M. and SMITH C. E., The morphology, taxonomy, and distribution of **Coccidioides immitis** Rixford and Gilchrist 1896. Farlowia, **1,** (2), 199—229, 1944.

BAKER R. D., Chronic progressive sporotrichosis in Mice. Federation Proc., **1,** (1), 173—174, 1942.

BAKER Z., HARRISON R. W. and MILLER B. F., The bactericidal Action of Synthetic Detergents. J. Exper. Med., **74,** 611, 1941.

BAKER Z., HARRISON R. W. and MILLER B. F., Actions of Synthetic Detergents on the Metabolism of Bacteria. J. Exper. Med., **73,** 249, 1941.

BAKER Z., HARRISON R. W. and MILLER B. F., Inhibition by Phospholipids of the Action of Synthetic Detergents on Bacteria. J. Exper. Med., **74,** 621, 1941.

BAKER W. J. a. RAGINS A. B., Actinomycosis of the testicle. J. Urol., U.S.A., **56,** 547—553, 1946.

BALINA P. L., BOSQ P., BARNATAN M. et HERRERA J., Un caso de blastomicosis ulcerosa. Beneficio de la sulfamidoterapia. Rev. argent. Dermatosif., **27** (3), 451—453, 1943.

BALINA P. L.,HERRERA J. A., BOSQ P. et NEGRONI P., Tercer caso argentino de histoplasmosis. Beneficio de la sulfamidoterapia. Rev. argent. Dermatosif., **27,** (3), 453—454, 1943.

BALINA P. L., NEGRONI P. et BASOMBRIO G., Oidiomicosis atipica, de dificil interpretaciòn. Rev. argent. Dermatosif., **24,** (1), 200—205, 1942. **(Candida albicans).**

BANKS H. S., Sporotrichose ressemblant à une diphtérie. Rapport d'un cas rare. Lancet, **251,** (6417), 270—272, 1946.

BARBOSA SIMOES F., Em torno de uma questao de nomenclatura botanica médica: **Paracoccidioides brasiliensis** (Splendore 1912) Almeida, 1930, o agente eziològico da forma brasileira da blastomicose (granuloma paracoccidioides). Jornal de Med. Pernambuco, **36,** (11), 429—444, 1940.

BARROCK J. J., Epidermatomycosis of the feet and hands. Urol. cutan. Rev., **48,** (1), 43—46, 1944. **(Epidermophyton interdigitale, E. gypseum, E. purpureum, E. inguinale, Monilia albicans).**

BARROS BARRETO A. L., Fungos produtores da doença de Pedroso e Carriòn (Cro-

moblastomicose on Cromomicose). Estado atual da questao. O Hospital, **23,** (4), 577—596, 1943; **23,** (5), 743—764, 1943.

BARTELS H. A., A filamentous microorganism isolated from stained teeth. J. dent. Res. U.S.A., **22** (2), 97—102, 7 fig., 1943.

BASU C. C., A note on a new strain of **Actinomyces, (Actinomyces mucosus** n. sp. Basu) obtained by blood culture from a case of bronchial (?) actinomycosis with metastases. Indian med. Gaz., **78,** (12), 577—578, 1943.

BEAMER P. R., SMITH E. B. and BARNETT H. L., Histoplasmosis. Report of a case in an infant and experimental observations. J. Pediat., **24,** (3), 270—280, 1944.

BECHET P. E., Cutaneous moniliasis. N. Y. St. J. Med., **43,** (21), 2065—2068, 1943. **(Monilia albicans).**

BENDOW E. P., SMITH D. T. and GRIMSON K. S., Sulfanamide therapy in actinomycosis. Two cases caused by aerobic partially acid-fast **Actinomyces.** Amer. Rev. Tuberc., **49** (5), 395—407, 1944. **(Actinomyces bovis, Nocardia).**

BENEDEK T., Critical Survey of the Mycological literature of the year 1938. Mycopathologia, **2,** (4), 267—316, 1940.

BENEDEK T., On the growth of **Microsporum audouini** and its production of perithecia on rice medium in the presence of a new stimulating saprophytic bacillus. Chron. bot., **7,** (5), 203, 1942.

BENEDEK T., Contribution to the epidemiology of tinea capitis. Urol. cutan. Rev., **47,** (7), 416—432, 1943.

BENEDEK T. and FELSHER I. M., Epidemiology of tinea capitis. I. A study of tinea capitis in a dispensary. Arch. Derm. Syph. Chicago, **49,** (2), 120—123, 1944. **(Microsporum audouini, M. lanosum, Trichophyton crateriforme, Achorion schoenleini).**

BENEDICT W. L. and IVERSON H. A., Chronic Keratoconjunctivitis associated with **Nocardia.** Arch. Ophthalmol. Chicago, **32,** 89—92, 1944.

BENNETT J. G., Actinomycosis with lung and liver involvement. Brit. med. J., (4335), 197, 1944.

BENNINGHOVEN C. D. and MILLER E. R., Coccidioidal infection in bone. Radiology, **38,** (6), 663—668, 1942. **(Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Debaryomyces neoformans).**

BERGNER K., **Microsporon equinum** und **Achorion gypseum** als Erreger von Flechtenerkrankungen bei Pferden. Z. Infekt Kr. Haustiere, **58,** 121, 141, 1942.

BERNHARDT E., A simplified method for staining fungi in skin and in nails. Arch. Derm. Syph. Chicago, **48,** (5), 533—534, 1943.) **(Monilia albicans, Trichophyton rubrum, Epidermophyton interdigitale, Achorion schoenleini).**

BERNHEIM F., The effect of various subsances on the oxygen uptake of **Blastomyces dermatitidis.** J. Bact., **44,** (5), 533—539, 1942.

BERNSTEIN T. and FEINBERG S. M., Air-borne fungus spores. Jour. of Allergy, St. Louis, **13,** (3), 231—241, 1942.

BIGHAM A., Some observation of skin diseases with the Army in India. Brit. J. Derm. Syph., **56,** (9—10), **199—202, 1944.**

BILLINGTON R. W., Actinomycosis treated with sulphapyridine. Brit. med. J., (4333), 326, 1944.

BINFORD C. H., HESS G. and EMMONS C. W., Chromoblastomycosis. Report of a case from continental United States and discussion of the classification of the causative fungus. Arch. Derm. Syph., **49,** (6), 398—402, 5 fig., 1944.

BINGHAM C. T. and MACKE R. L., Dermatologic practice in the South Pacific. A review of 1.500 cases. Nav. med. Bull., Wash., **43,** (1), 17—24, 1944.

BLAIN A. W., Primary actinomycosis of the Stomach: report of a case. J. Am. Med. Ass., **100,** 168—169, 1933.

BLAIR D., Torulosis of the central nervous system. J. ment. Sci., **89,** (374), 42—51, 1943.

BLOCK W. M., Mycotic pulmonary infections. Report of a case. Iowa St. med. sov. J., **33,** 108, 1943.

BOASE A.J., Case of rhinosporidiosis in a native of Uganda. East Afr. med. J., **28,** (9), 270, 1941.

BOEING P. J. and LAFFER N. C., A preliminary report on a selective medium for the isolation of pathogenic Fungi. J. of Bact., **54**, (1), 91, 1947, **(Blustomyces, Candida, Sporotrichum, Histoplasma Coccidioides, Monosporium, Paracoccodioides).**

BOGRAD N., Treatment of tinea with ethyl chloride. Arch. Derm. Syph. Chicago, **48**, (5), 511, 1943.

BOLANOS E. L. et TREJOS W. A., Multiple coincidencias en dos casos de esporotrichosis facial. Rev. méd. San José, **5**, (105), 369—372, 1943.

BOLGERT et BENOIT, Epidermomycose. Soc. franc. Dermat. Syphil., Seance, 12 Decembre, 1946.

BONNER J., SANDOVAL A., TANG Y. W., ZECHMEISTER L., Changes in polyene syntesis induced by mutation in a red yeast **(Rhodotorula rubra).** Arch. Biochem. U.S.A., **10**, 113—123, 1946.

BORODIN N., PHILPOT F. J. and FLPREY H. M. An antibiotic from **Penicillum tardum.** Brit. J. exper. Pathol., **28**, (1), 31—34, 1947.

BOSCH R. G., Actinomicosis toracica. Actinomicosis pulmonar primitiva. Dia méd. B. Aires, **15**, (18), 406—410. **(Proactinomyces israeli).**

BOSCH R. G., Actinomicosis cervico-facial. Empiema actinomicotico. Tabes artropatica. Dia méd. B. Aires, **15** (20), 478—483, 1943.

BORCO J. La malattia di Kaposi ed il preteso emofungo di N. Greco. Settimana Medica, 35—39, 132—138, 1946.

BOTVINICK I., PECK S. M. and SCHWARTZ L., An outbreak of **Microsporon lanosum** infection from a Kitten. Publ. Hlth. Rep., Wash., **58**, (8), 317—319. 1943.

BREA M. M., SANTAS A. A. et FUSTINONI O., Actinomicosis mediastinica. Bol. Inst. Clin. quirurg., B. Aires, **19**, (162), 682—689, 1943.

BRODERS A. C., DOCHAT G. R., HERRELL W. E. and VAUGHN L. D., Histoplasmosis producing vegetative endocarditis. Review of literature, with report of a case. J. Amer. med. Ass., 122, 489—492, 1943.

BROWN A. E., The problem of fungal growth. Med. Plast., U.S.A., **26**, 189—195, 1946.

BROWN, J. H., A micro culture slide for Fungi., J. Bact., **43**, 16, 1942.

BROWN J. M., Actinomycosis of the temporal bone. Laringoscope, St. Louis, **52**, (7), 507—513, 1942.

BROWNING W. H., Mold fungi in the etiology of respiratory allergic diseases. II. Mold extracts-a statistical study. J. Allergy, **14**, (3), 231—243, 1943.

BUENO P. et FARIA P. N., Rinosporidiose em Muar. Arq. Inst. biol. S. Paulo, **12**, (20), 297—302, 1941. **(Rhinosporidium seeberi).**

BUER A. W., Uber Luftsackmykose beim Pferd. Skand. Vet Tidskr., **32**, 593—609, 1942.

BURGER E. and MORTON C. B., Torula infection. A review and report of four cases. Surgery, St. Louis, **15**, (2), 312—325, 1944. **(Torula histolytica, Debaryomyces neoformans.)**

BUSH J. D., Coccidioidomycosis. J. med. Ass. Ala., **13**, (5), 159—166, 1943.

BYRNE E. A. J. and CROXON J. H., Bactericidal and fungicidal action of organic mercurials with special reference to the dermatomycoses. Indian med. Gaz., **79**, (8), 357—361, 1944. **(Epidermophyton sp., E. inguinale).**

CALDWELL G. T., Secondary (granulomatous) coccidioidomycosis-coccidioidal granuloma. Texas St. J. Med., **38**, 376, 1942.

CALLAWAY J. L., Dermatophytid. Sth. Med. Surg., **104**, (1), 21, 1944.

CAP DE HOURAT E. L., GINI R. A. and JORG M. E., Pulmonary blastomycosis with cavitation. Rev. Asoc. med. argent., **57**, 149, 1943. **(Monilia, Candida).**

CARLINFANTI E., Sul meccanismo d'azione della penicillina. Clin. nuova, **1**, 176—178. 1945.

CARLINFANTI E., Ricerche sulla batteriolisi da penicillina. Boll. Ist. Sierot. Milanese, **24**, (Genn.-Giugno), 42—47, 1945.

CARO M. R., Fungous infections of the foot. J. Amer. med. Ass., **124**, (12), 751—756, 1944. **(Trichophyton gypseum, T. purpureum, Monilia albicans, Actinomyces, Madurella, Sporotrichum schencki, Blastomyces dermatitidis, Phialophora verrucosa).**

CARRIÓN A. L., The specific fungi of chromoblastomycosis. Puerto Rico J. Pub. Health. Trop. Med., **15**, (4), 340—361, 1940.

CARRIóN A. L., Chromoblastomycosis. Mycologia, **34**, (4), 424—441, 1942.

CARRIóN A. L. and SILVA M., Ringworm of the scalp in Puerto Rico. P. R. J. publ. Hlth, **19**, (3), 329—391, 1944. **(Microsporum canis, M. gypseum, Trichophyton tonsurans, T. mentagrophytes, T. sabouraudi, T. flavum).**

CARSLAW R. W., The diagnosis and treatment of tinea infection. Med.Pr.,(5405), 376—377, 1942. **(Epidermophyton).**

CARTER R. A., The Roentgen diagnosis of fungous infections of the lungs with special reference to coccidioidomycosis. Radiology, **38**, (6), 649—659, 1942.

CASABLANCA et TEMIME, Eruption seconde on allergides dermatophitiques. Soc. Franc. Derm. et Syph., Seance 13 mars 1947.

CASIELLO A., Micosis bronco-pulmonar. Diagnostico precoz. Curacion. Rev. med. Rosario, **33**, (7), 684, 1943.

CASSADY J. V., Uveal blastomycosis. Arch. Ophthalm. U.S.A., **35**, 84—97, 11 fig., 1946.

CASSELS D. and STEINER P., Mycotic endocarditis: report of a case with necropsy; review of the literature. Am. J. Dis. Child., **67**, (2), 128—138, 1944.

CASTRO PALOMINO J. et ALFONSO Y. ARMENTEROS J., Los micetomas. Rev. Med. trop. Habana, **8**, (2), 20—27, 1942. **(Actinomyces, Madurella, Indiella, Aspergillus, Penicillum, Alternaria,** and **Oospora** spp.)

CATANEI A., Sur l'apparition des appareils sporiféres dans les cultures du champignon du favus. Arch. inst. Pasteur Algér., **19**, (2), 198—208, 1941.

CATANEI A., Sur des changements de caractéres culturaux de **Nocardia madurae.** Etude morphologique et experimentale. Arch. Inst. Pasteur, Alger., **20**, (4), 299 304, 1942.

CATANEI A., Les teignes de la Souris blanche à Alger. Arch. inst. Pasteur Alger., **20**, (4), 305—308, 1943. **(Ctenomyces (Trichophyton) mentagrophytes, Achorion schoenleini).**

CATANEI A., Etude morphologique de souches **d'Achorion schoenleini** isolées dans une localité d'Algérie. Arch. inst. Pasteur Algér., **21**, (1), 7—11, 1943.

CATANEI A., Sur les modifications morphologiques des champignos pathogénes. Arch. inst. Pasteur Algér., **21**, (3), 180—185, 1943. **(Ctenomyces mentagrophytes, Achorion schoenleini. Microsporum canis, Nocardia madurae).**

CATANEI A., Etude de l'allergie (par l'intradermo-reaction) et de la resistance acquises dans les mycoses experimentales du Cobaye. Arch. inst. Pasteur Algér., **21**, (4), 255—262, 1943. **(Nocardia madurae, Sporotrichum biparasiticum, Ctenomyces mentagrophytes).**

CATANEI A., Las champignons-parasites de la dermatite verruquense mycosique en Algerie. Arch. inst. Pasteur Algér., **22**, (2), 113—118, 1944. **(Hormodendrum algeriensis, Phialophora verrucosa).**

CATANEI A., Sur quelques champignons saprophytes isolés au cours de la recerche de mycoses superficielles. Arch. inst. Pasteur Algér., **22** (2), 119—120, 1944. **(Monascus purpureus, Actinomyces alboflavus, A. albosporeus, Cephalosporium acremonium, Achorion schoenleini, Acremoniella olivaespora, Malassezia furfur, Actinomyces aureus, Trichophyton discoides).**

CATANEI A., Nouvelles observations sur les tignes en Algérie et dans les colonies françaïses. Arch. inst. Pasteur, Algér., **24**, (2), 116—121, 1946.

CATANEI A. et IZAC R., Nouvelle teigne d'origine animale observée chez un indigéne algérien. Arch. Inst. Pasteur Algér., **19**, (3), 339—341, 1941.

CAVALLERO C., L'allergia e l'immunità nelle micosi., Mycopathologia, **2**, (4), 219, 1940.

CAVALLERO C., L'allergia e l'immunità nelle micosi: 1º Concetti generali sull'allergia etc.; 2º Allergia e immunità nelle micosi da lieviti. Mycopathologia, **2**, (4), 1940; **3**, (1), 1941.

CELIS PEREZ A., Un caso de cromo-blastomicosis de localizaçion nasal y laringea. Gac. méd. Caracas, **50**, (1), 8—10, 1943.

CHAVES E., Sobre um caso de micose pulmonar. Med.-Cirurg.-Pharm., (87), 315—317, 1943.

CHEMICAL ENGINEERING CATALOG, The condensed Chemical Dictionary, 1942.

CHENEY G. A. and DENENTOLZ E. J., Observations on coccidiodin skin test. Military Surgeon Wash., **96**, 148, 1945.
CHIRIFE A., La Paracoccidioidosis en el Paraguay. An. Fac. Cienc. Méd., **4**, (19), 1944.
CHITTY H., Recovery from actinomycosis of the liver. Brit. Med. J., (4333), 115, 1944.
CHODAT F., Emploi des rayons ultraviolets pour la classification des Levures. Actes Soc. helv. Sci. Nat., **124**, 131—132, 1944.
CHRISTENSON G. L., RUDERT F. J. and FATER M. J., Effect of addition of streptomycin to submerged sultures of **Streptomyces griseus.** Proc. of the Ohio branch of the Soc. of Amer. Bacteriol., 7 december, 1946.
CITRON S. R., The role of **Actinomyces israeli** in salivary calculus formation. J. dent. Res. U.S.A., **24**, 87—91, 1946.
CLARK D. and GILMORE J. A., Study of 100 cases with positive Coccidioidin Skin Test. Ann. intern. Med. Lancaster Pa., **24**, 40, 1946.
CLEVELAND D. E. H., Infectivity of fluorescent hairs in scalp ringworm. Canad. med. Ass. J., **49** (4), 280—282, 1943. **(Microsporum lanosum).**
COCO A. F., The adjuvant affect of aerosol upon the germicidal action of cadmium chloride. J. Lab. clin. Med., **29**, (7), 689—691, 1944. **(Candida albicans).**
COCHET G., Résultats statistiques sur la flore mycologique intestinale de quelques Rongeurs de la faune de France. Ann. Parasitol., **21**, (3—4), 169—176, 1946.
COHEN D. L., Primary actinomycosis of the kidney: case report. J. Urol., **50**, (1), 29—33, 1943.
COLBURN J. R., Roentgenological type of pulmonary lesions in primary coccidioidomycosis. Amer. J. Roentgenol., **51**, (1), 1—8, 1944.
COLIN—RUSS A., Further observations on the control of mould growth in leather and fabric material. J. int. Soc. Leather Trad's Chemists, G. B., **30**, 172—185, 1946.
COLONNA P. C. and GUCKER T., Blastomycosis of the skeletal system. A summary of 67 recorder cases and a case report. J. Bone Jt. Surg., **26** (2), 322—328, 1944.
COLVIN S. H., GORE I. and PETERS L., A case of histoplasmosis (Darling) with autopsy. Amer. J. med. Sci., **207**, (3), 378—385, 1944.
COMANDON J., FONBRUNE P. De et VELU M., Perfectionnement aux techniques d'isolement des microorganismes par micromanipulation. Application aux spores de **Penicillium.** Ann. inst. Pasteur, **72**, 701—703, 1946.
CONANT N. F., Laboratory study of **Blastomyces dermatitidis** Gilchrist and Stokes 1898. Proc. sixth Pacif. Sci. Congr. 1939, 853—861, 1942.
CONNANT N. F., MARTIN D. S., SMITH D. T., BAKER R. D. and CALLAWAY J. L., Manual of Crinical Mycology. Saunder, Philadelphia and London, 1944.
CONANT N. F. and HOWELL A., Similarity of fungi causing South American blastomycosis (paracoccidioidal granuloma) and North American blastomycosis (Gilchrist's disease). J. invest. Derm., **5**, 353—370, 1942.
CONSTAM G. R., Sulfanilamidtherapie in einem Fall von Lungenaktinomykose. Schweiz. med. Wschr., **78**, (1), 9—10, 1943.
COOK A. H. and LACEY M. S., Production of antibiotics by Fungi. Brit. J. exper. Pathol., **26**, 404—409, 1945. **(Aspergillus, Fusarium, Chaetonium, Trichoderma).**
CORNBLETT T. a. MEYER E., Sweat as a culture medium for Fungi. New Engl. J. Med., **230**, (20), 604—607, 2 fig., 1944.
CORNBLEET T., SCHORR H. C. and POPPER H., The mosaic fungus: a cholesterol intercelluler artefact. Arch. Derm. Syph., Chicago, **48**, (3), 282—287, 1943.
CORNELL A. and SHOOKHOFF H. B., Actinomycosis of the heart simulating rheumatic fever: report of three cases of cardiac actinomycosis, with a review of the literature. Arch. intern. Med., **74**, (1), 11—27, 1944.
COSTA O. G., **Microsporon** infections of the palpebral and ciliary regione. Arch. derm. Syph., Chicago, **48**, 65—69, 1943. (Microsporum felineum).
COSTA O. G., Esporotricose no Brasil. Brasil. Méd., **57**, (34—35), 343—347, 1943.
COSTA O. G. and JUNQUEIRA M. A., Tinea versicolor involving the scalp. Arch. Derm. Syph., Chicago, **47**, (4), 546—552, 1943. **(Malassezia furfur).**
COUTELEN F. et COCHET G., Les rongeurs domestiques, réservoirs de virus en mycopathologie humaine et vétérinaire. Ann. Parasit. hum. comp., **19**, 85—95, 1942.

COUTINHO A. et RUSSO E., Um caso de epsorotrichose por **Sporotrichum schenckl.** Brasil méd., **56,** (36), 419—420, 1942.

CRIEP, Allergy to Penicillin. J. Am. Med. Ass., **126, 429, 1944.**

CRITTEDEN Phoebe J., WESTFIELD N. J. and JOINER Luella S., Cotton hose as a vehicle for a fungicide in tratment of athlete's foot. J. Lab. clin. med., **29,** (6), 606—608, 1944.

CROWELL I. H., Use of dichloricide in the control of scavenger mites in test tube cultures., Mycologia, **33,** (1), 1941.

CURY A., Açao fungistatica da tirotricina „in vitro". Brasil Medico, Ano 60, Ns. 33, 34, 35, 1946.

DA FONSECA, Granulomatoses blastomycoides benignes. Academie de Medecine (Paris), Seance 17 dicembre, 1946. **(Glenosporella Loboi).**

DAN BERCEAM M. et LEVENF M., L'ascomycetotherapie aux sacharomycetes dans les infections chirurgicales à harteries pyogenes. Acad. de Chirurgie, Paris, Seance, 21 mai, 1947.

DANCIS J. et NUNEMAKER J. C., Meningites coccidioidienne. Rocky Mountein M. J., **43,** (8), 639—642, 1946.

DANON L., Actinomycose annexielle et péritonéale. C. R. Reunion 16—5—1946. Soc. Ostet. et gynec. de la Suisse Romande. Ref. Schw. Med. Wsch., 7, 1947.

DAVIDSON A. M. and BIRT A. R., Recurring vesicular eruptions of the hands. Canad. med. Ass. J., **49,** (2), 97—101, 1943.

DAVIS B. L. jr., SMITH R. T., SMITH C. E., An epidemie of coccidioidal infection (coccidiomycosis). J. amer. med. Ass., **118,** 1182—1186, 1942.

DAVIS E. L., Mycotic ear infections at an advanced Allied base. Med. J. Aust., **30,** (22), 437—438, 1943.

DAVOLI R., Titolazione in vitro di penicillina. Lo Sperimentale, **98,** (1—2), 89—97, 1946.

DEARING W. P., OLSON B. J., SELF R. W. and BAGGETT M. W., A comparison of household attack rates in regions with high and low tuberculosis mortality. Nat. Tuberc. Assoc. Transactions, **37,** 316, 1941.

DEBRE', LAMY, NICK, NORMAND et GRUMBACK, Torulosi e granuloma maligno. Presse Méd., (34), 492, 1946.

DE CASTRO M., As tinhas no Brasil. Gaz. clin. S. Paulo, June, 197, 1942.

DE LAMATER E. D., Experimental studies with the dermatophytes. IV. The influence of age upon the allergic response in experimental ringworm in the Guinea Pig. J. Invest. Derm., **5,** (6), 423—429, 1942. **(Trichophyton sypseum).**

DELAPORTE B. et SACCAS M., Etude morphologique et cytologique de plusieues souches de **Penicillium notatum** Westling. Soc. franc. de microbiologie, scance 6 mars, 1947.

DELITSCH H., Die pathogenen Eumyceten. Voor Pfl. Lebensm. Forsch., **5,** 281—292, 1942.

DE LOUREIRO J. A., Production of pigments and of Penicillin in cultures of **Penicillium notatum,** Medicina Clinica (Barcelona), **5,** 341, 1945.

DEL VECCHIO G. e ARGENZIANO R., Proprietà antibiotiche di alcuni stipiti di **Penicillium** Link. Nota VI: Azione antibiotica della Penicillina sulla **Brucella.** Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 19 genn., 1946.

DE MELLO I. F., A report on the characters and identification of the yeasts living in commensalism in the intestine of some laboratory animals. Proc. Indian Acad. Sci., **12,** (1), 17—28, 1940.

DE MORAIS GREY J., Actinomicose do membro inferior e desarticulaçao da da coxa. Bol. Col. brasil. Cirurg., **17,** (1), 1—16, 1942.

Dermatomycosis in a Dog produced by **Microsporum (Achorion) gallinae.** J. Amer. vet. med. Ass., **102,** (794), 383—384, 1943.

DE ROP R. S., La penicillina come ormone vegetale. Nature, **158, 555,** 1946.

DERZAVIS J. L. and PAPPEN J. R., A campaign against „athlete's foot". Nav. med. Bull., Wash., **43,** (3), 600—602, 1944.

DEY N. C. and CHOSH L. M. Studies of ringworm. Part. I. **Microsporum auduini** infection in India. Indian med. Gaz., 79, (2), 51—55, 1944.

DEY N. C. and MAPLESTONE P. A., Tinea inbricata in India. Indian Med. Gaz., **77,** (1), 5—6, 1942.

DI FONZO M., Su una reazione cromatica delle Penicillina. La Ricerca Scientifica, **15,** (4—5), 419, 1945.

DIMOND N. S. and THOMPSON K. W., The effect of sulfonamide drugs on **Trichophytons** in vitro. J. ingest. Derm., **5,** (6), 397—402, 1942. **(Trichophyton purpureum and T. gypseum).**

Discussion on radiotherapy in chronic inflammatory conditions with special reference to mycotic infections. Proc. Roy. Soc. Med., **37,** (12), 717—719, 1944.

DOBES W. L., Moniliasis of the external ear canal. Sth. med. J., Nashville, **34,** (9), 614—616, 1943.

DOBSON L. and CUTTING W. C., Penicillin and sulfonamides in actinomycosis. J. Am. Med. Assoc., **128,** 856—963, 1945.

DOMAGK G. et HEGLER C., Quimioterapia da les infecciones bacterianes. Editorial Lamor, S. A. Argentina, 1944.

DORREL W. W. and KNIGHTS S. G., Microrespiration studies with Fungi. J. of Bacter., **54,** (1), 16, 1947.

DORREL W. W. and PAGE R. M., The use of fragmentated mycelial inoculum in the culture of Fungi. J. of Bacter., **53,** (3), 360—361, 1 fig., 1947.

DOUGLASS R. and SIMPSON R. E., **Cephalosporium** in pleural fluid. Amer. Rev. Tuberc., **48,** (4), 237—240, 1943.

DOWING Eleanor S., The spores of dermatophytes. Canad. J. Res., **22,** (4), 67—77, 1944. **(Microsporum lanosum, Trichophyton gypseum, M. audouini, T. crateriforme, T. violaceum, T. schoenleini, T. rubrum, Epidermophyton floccosum, T. otae).**

DOWNING J. G., Dermatophytosis and occupational dermatitis. J. Amer. med. Ass., **125,** (3), 196—200, 1944.

DOZIER H. L., Occurrence of ringworm disease and lumpy jaw in the Muskrat in Maryland. J. Amer. vet. med. Ass., **102,** 451—453, 1943.

DRAKE C. H., The action of Penicillin on several genera of the Actinomycetales. J. of Bacteriology, **51,** (2), 199—203, 1946.

DRAKE C. H., The occurrence of natural antibodies against certain yeastlike fungi. J. Bact., **46,** (5), 486—487, 1943. **(C. krusei, Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis pulcherrima).**

DRAKE C. H., Studies on a species of **Trichosporon.** Proc. Northwest. branch of the Soc. of the Amer. Bacter., 23 nov., 1946.

DRAKE C. H. and HENRICI A. T., **Nocardia asteroides.** Its pathogenecity and allergic properties. Amer. Rev. Tuberc., **48,** (3), 184—198, 1943. **(Nocardia (Proactinomyces) asteroides, Mycobacterium tuberculosis.)**

DRAKE C. H., SUDLER M. T. and CANUTESON R. I., A case of staphylococcic actinophytosis (botryomycosis) in man. The J. of the Am. med. Ass., **123,** 339—341, 1943.

DROBOTKO V. G., Stachybotryotoxicosis: new disease of Horses and Humans. Am. Rev. of Soviet Med., **2,** 238, 1945.

DUARTE H., Histoplasmose. Memorias do Inst. O. Cruz, **43,** (3), 457—494, 1945.

DULANEY E. L., HODGES A. B. and PERLMAN D., Physiological studies on **Actinomyces griseus.** J. of Bacter., **54,** (1), 1, 1947.

DUNCAN J. T., Systemic mycoses. Lancet, **242,** (6187), 393—395, 1942.

DU TOIT C. J., Sporotrichosis on the Witwatersrand. Proc. Transv. Mine med. Offrs'. Ass., **22,** (241), 111—127, 1942.

DU VIGNEAU V., MACKENNIS H. jr., SIMMONDS S., DITTMER K. and BROWN G. B., The inhibition of the growt of yeast by thiénylalanine. J. bioch. Chem. **159,** 385—394, 1945.

EDGECOMBRE A. E., **Trichophyton purpureum (Bang)** and **Trichophyton gypseum** (Bodin): differentiation in culture. Arch. Derm. Syph., Chicago, **46,** (5), 651—660, 1942.

EMMONS C. W., Fumigation of mits infested culture of Fungi. Mycopathologia, **2,** (4), 1940.

EMMONS C. W., Coccidiomycosis. Mycologia, **34,** (4), 452—463, 1942.

EMMONS C. W., Coccidioidomycosis in wild rodents. A method of determining the extent of endemic areas. Publ. Hlth. Rep., Wash., **58,** (1), 1—5, 1943. **(Coccidioides immitis).**

EMMONS C. W., **Allescheria boydii** and **Monosporium apiospermum.** Mycologia **36,** (2), 188, 193, 1 fig., 1944.

EMMONS C. W., Misuse of the Name **Trichophyton rosaceum** for a Saprophytic **Fusarium.,** J. Bact., **47,** (50), 107—108, 1944.

EMMONS C. W., **Phialophora jeanselmei** comb. N. from mycetoma of the hand. Arch. of Path., **39,** 364—368, 1945.

EMMONS C. W. and ASHBURN L. L., The isolation of **Haplosporangium parvum** n. sp. and **Coccidioides immitis** from wild rodents. Their relationship to coccidioidomycosis. Publ. Hlth Rep., Wash., **57,** (46), 1715—1727, 1942.

EMMONS C. W., OLSON B. J. and ELDRIDGE W. W., Studies of the role of fungi in Pulmonary disease. I. Cross reactions of Histoplasmin. Publ. Health Reports (no. 2676) **60,** (47), 1383—1394, 1945.

Enquiry into medical mycology under Dr. P. A. Maplestone at the School of Tropical Medicine, Calcutta. Rep. Sci. adv. Bd Indian Res. Fund. Ass., 1942; 81—83, 1943. **(Epidermophyton floccosum, Malassezia (Pityrosporum) ovale.)**

Epidemic of ringworm in New York City. J. Amer. med. Ass., **125,** (17), 1194, 1944. **(Microsporum audouini).**

ERRINGTON P. L., Observations on a fungus skin disease of Iowa Muskrats. Amer. J. vet. Res., **3,** 195—201, 1942.

Experimental cutaneous reactions of American blastomycosis in the Guinea pig. J. invest. Derm,, **5,** 353, 1942.

FARRELL A. W., Bronchomoniliasis. Canad. med. Ass. J., **48,** (1,) 28—30, 1943.

FAZAKAS A., Ueber Pilzerkrankungen der Hornhaut. Klin. Mbl. Augenheilk., **106,** 56—63, 1941.

FEDER J. M. and TRIBBLE Evelyn., Histoplasmosis of Darling. A brief review of available literature. Sth. Med. Surg., **106,** (1), 20—21, 1944.

FELSENFELD O., Yeast-like fungi in the intestinal tract of chronically institutionalized patients. Amer. J. med. Sci., **207,** (1), 60—63, 1944. **(Monilia, Cryptococcus, Geotrichum, Candida albicans, C. parapsilosis, C. krusei).**

FERGUSON R. and UPTON M. F., The isolation od **Paracoccidioides brasiliensis** from a case of South American Blastomycosis. Proc. of Connecticut Valley branch of the Soc. of the Amer. Bacter., 7 desember, 1946.

FERREIRA A. L., Problemas de micologia médica em Moçambique. Bol. Soc. Estud Colòn. Moçambique, **10,** (44), 33—64, 1941.

FERREIRA A. J. DE L., Primeiros subsidios para o estudo da micologia medica em Moçambique. Bol. Soc. Estud. Colon. Moçambique, **11,** (45), 39—67, 1942. **(Epidermophyton, Trichophyton rubrum, Candida triadis).**

FIALHO A., Localizoçoes pulmonares da blastomicose brasileira. Bol. no. 8 Acad. Nac. Med., 1945.

FIEIRA FILHO J. et MARTIRANI I., Micetoma podal de graos vermelhos (Pé de Madura). Rev. de Medicina, **5,** (79), 1940.

FIENBERG R., Madura Foot in a native American. Amer. J. Clin. Pathol., **14,** (4), 239—246, 5 fig., 1944.**(Monosporium apiospermum).**

FINOCCHIARO M., A radioterapia associada ao iodo na micose pulmonar. An. paul. Med. Cirurg., **46,** (1), 29—32, 1943.

FLEMING R. S. and QUEEN F. B., Penicillin resistance: II. Of Fungi. Am. J. of Clin. Pathol., Baltimora, **16, 66,** 1946.

FLEMMING REYMANN and SCHWARTZ M., House Dust and Fungus Allergy., Acta Pathol. et Microb. scandinavica., **24,** (1), 76—85, 1947.

FLO S. C. and SMITH P. E., Sporotrichosis, report of a case. New Engl. J. Med., **234,** 50—52, 3 fig., 1946.

FLOREY H. W., JENNINGS M. A. and SANDERS A. G., Biological investigation on proactinomycin. Brit. J. exp. Path., **26,** 337—349, 1945. **(Proactinomyces (Nocardia) gardneri).**

FOSHAY L. and NADDEN A. G., The Dog as a natural host for Blastomyces dermatitidis. Amer. J. trop. Med., **22**, 565—569, 1942.

FOSTER J. W., WOODRUFF H. B. and MacDANIEL L. E., Microbiological aspects of penicillin. III. Traduction of penicillin in surface cultures of **Penicillium notatum.** J. Bacter., U.S.A., **51**, 465—478, 1946.

FOSTER J. W., WOODRUFF H. B., MacDANIEL L. E., Microbiological aspects of penicillin: IV. Production of penicillin in submerged cultures of **Penicillium notatum.** J. Cacter., U.S.A., **51**, 465—478, 1946.

FRANKS A. G. and TAYLOR H. G., Cutaneous blastomycosis complicated by meningitis. Arch. derm. Syph., Chicago. **48**, (1), 88—90, 1943.

FUENTES C. et ANGULO J. J., Una nota aclaratoria en la polémica sobre la identidad de un **Actinomyces madurae** identificado por el Dr. Pedro Domingo y descripto por los Doctores Oteyza, Ramirez Corria y Armaz. Rev. Med. trop., Habana, **8**, (5), 67—68, 1942.

FULLER C. C. and WOOD H., Actinomycetic granuloma of the Stomach., J. Am. Med. Ass., **129**, (17), 1163—1165.

GABRIELSEN E. K., Studies on **Trichophyton interdigitale** Priestley. I. Influence of the temperature on the growth of the fungus. II. Thermoresistance of the fungus, Acta Dermato-venereol., Stockh., **23**, (5), 405—415, 1943.

GAUMANN E., Immunreaktionen und Immunität bei Pflanzen. Schw. Z. f. Pathol. u. Bakter., **7**, (4), 407—441, 26 figg., 1944.

GAUMANN E., Ueber pathogene Pilze, die Pflanzen und Menschen befallen. Experientia, **1**, (1), sep. 1—8, 1945.

GALLOWAY L. D. and BURGESS R., Applied Mycology and Bacteriology. London, L. Hill., VIII, 187, 1940.

GARDINER S. S., Actinomycosis of the urinary system. Aust. N. Z. J. Surg., **12**, (3) 207—226, 1943.

GAVINA ALVARADO E. R., Tratamiento de las micoses de los pliegues cutaneos. Prensa med. argent., **30**, (32), 1479—1482, 1943. **(Epidermophyton, Trichophyton).**

GEIGER A. J., WEN NER H. A., AXILROD H. D. and DURLASBER S. H., Mycotic endocarditis and meningitis: report of case due to **Monilia albicans.** Jale J. of Biol. a Medicine, New Haven, **18**, 259, 1946.

GEORGI C. E., Inhibitory effect of monochlormercuricarvacrol on growth of pathogenic fungi. Arch. Derm. Syph., Chicago, **48**, (5), 497—510, 1943. **(Epidermophyton inguinale, E. interdigitale, T. purpureum, T. rosaceum, T. gypseum, Monilia albicans, M. candida).**

GILMAN J. C., A manual of Soil Fungi. Vol. 392 pagg. Ames, Jowa, 1945 (The Collegiate Press, Inc.).

GIOIELLI F., L'azione del benzopirene, dibenzantracene, metilcolantrene sulla pigmentazione dei funghi. Annali della Università di Ferrara, **5**, 1944—45.

GIROTTI F. e VERITA' E., La penicillina. Zavatti Ed. Forlì, 111 pagg., 1945.

GIUDICE D., Histopatologia del sistema nervoso en la torulosis experimental. An. Fac. Med. Montevideo, **31**, (1—4), 100—113, 15 figg., 1946.

GIUNCHI, L'azione della penicillina sugli actinomiceti. La Clinica Nuova, **1**, 190, 1945.

GIUNCHI G., Attinomicosi temporo-mascellare da actinomicete anaerobio tipo „Wolff-Israel" guarita con trattamento combinato sulfamidico e roengenterapico. Il Policlinico (Sez. Prat.), **53**, (17—18), 354—361, 1946.

GLENN W. R. and HAILEY H., Tinea versicolor. Nav. med. Bull., Wash., **41**, (1), 205—206, 1943. **(Microsporum (Malassezia) furfur).**

GLENN W. R. and HALLEY H. E., Fungous infections of the feet treated with a camphor-phenol mixture. Arch. Der Syph., Chicago., **47**, (2), 239—241, 1943.

GOIDANICH G., Gli studi fitopatologici e la scoperta della penicillina. Annali d'Igiene, **56**, (1), 1946.

GOIDANICH G., La penicillina e la patologia vegetale. L'Italia agricola, **83**, (2), 85—92, 6 fig., 1946.

GOLDING N. S., The oxygen requirements of Molds. Proc. of Northwest branch of the Soc. of the Amer. Bacteriol., 23 nov., 1946.

GOLDMAN L., HENNINGSEN A. B., RINGELMAN N. P., FOW H. H. and HESSELBROCH J., Evaluation of a Fungicidal agent for fungous diseases of the feet. A controlled hospital study. Arch. Derm. e Syph., **47**, (4), 569—573, 1943.

GOLDSTEIN D. M. and LOUIE S., Primary pulmonary coccidioidomycosis: report of an epidemie of 75 cases. War Med., Chicago, **4**, (3), 299—317, 1943. **(Coccidioides immitis).**

GOLDSTEIN D. M. and McDONALD J. B., Primary pulmonary coccidioidomycosis: follow-up of 75 cases, with 10 more cases from a new endemic area. J. Amer. Med. Ass., **124**, (9), 557—561, 1944.

GONZALES OCHOA A., El **Microsporum canis** (Bodin y Almin, 1897) en México. Rev. inst. Salubr., **2**, 319—326, 1941.

GONZALES OCHOA A., Hallazgo del **Fonsecaea pedrosoi** var. **cladosporioides** en México. Rec. Inst. Salubr., **2**, (2), 187—192, 1941.

GONZALES OCHOA A., El micetoma por **Actinomyces mexicanus** Boyd y Crutchfield, 1921, en México. Rev. Inst. Salubr., **3**, (4), 303—317, 1942.

GONZELES OCHOA A., Actinomicosis de Mexico. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop., **3**, 303, 1942.

GONZALES OCHOA A. et OROZCOC Natalina. Los hongos del aire en la ciudad de Mexico. Sus relaciones con los factores atmosfericos. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop., **4**, (3), 259—264, 1943. **(Hormodendrum, Penicillum, Alternaria).**

GONZALES OCHOA A. et RUILOBA J., Accion del propionato de sodio „in vitro" sobre **Actinomyces mexicanus y Cephalosporium** sp. Ensayo terapeutico en micetomas producidos por estos hongos. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop., **5**, (2), 83—86, 1944.

GONZALES OCHOA A. et SANDOVAL M. De Los A., Estudios sobre cinco especies del género **Candida** Berkhout 1923, causantes de lesiones humanas. Rev. Inst. Salubr., **4**, (2), 149—161, 1943. **(Candida albicans, C. guilliermondi, C. pseudotropicalis, C. parakrusei** and **C. deformans).**

GONZALES OCHOA A. et SANDOVAL M. De Los A., Aislamento de **Actinomyces** microaerofilicos en amigdales humanis. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop., **4**, (4), 319—322, 1943.

GONZALES TORRES D. M., Actinomicetoma toracico a graos pretos. Consideraçoes sobre um caso. Arquivos de Biologia, Ano 24, no 223, Sao Paulo, 1940.

GOODMAN H., Communicable disease control measures stressing eradication of epidemic ringworm of the scalp of school children. Urol. Cutan. Rev., **48**, (2), 90—95, 1944. **(Microsporum audouini).**

GOODMAN H., Fluorescence in dermatology. Urol. cutan. Rev., **48**, (3), 119—122, 1944.

GOREN M. L., Localized coccidioidomycosis of a bone. L. Bone Joint Surg. **28**, 157—160, 2 figg., 1946. **(Coccidioides immitis).**

GOTTLIEB A., Madura foot or mycetoma. Report of two cases. West. J. Surg., **52**, (6), 264—265, 1944.

GOUVERNEUR P. et ABOULKER P., Un cas d'actinomyceose rénale primitive. Soc. Franç. d'Urologie, Paris. Seance 18 nov., 1946.

GOVINDA Nair R., Ringworm in Vizagapatam. J. Indian med. Ass., **11**, (12), 368—372, 1942. **(Epidermophyton inguinale).**

GRAHAM V. E. and HASTINGS E. G., Studies on film-forming yeasts. I°: Media and methods. Canad. J. Res., Sect. C., **19**, 251—256, 1941.

GRANA A., Contributo allo studio delle micosi (a proposito di un caso clinico). Giorn. Ital. Dermat. Sif., **87**, (2), 121—138, 1946.

GREER A. E. and GEMOETS H. N., The coexistence of pathogenic fungi in certain chronic pulmonary diseases: with especial reference to pulmonary tuberculosis (a preliminary report). Dis. Chest., **9**, (3), 212—240, 1943. **(Saccharomyces hominis, Cryptococcus hominis (Debaryomyces neoformans), Sporotricheum schencki, Sterigmatocystis (Aspergillus) nidulans, A. fumigatus Cryptococcus, Monilia, Sporotrichum, Acremonium, Saccharomyces** and **Aspergillus).**

GREGORY J. E., GOLDEN A. and HAYMAKER W., Mucormycosis of the central nervous system. A. report of three cases. Bull. Johns Hopkins. Hosp., **73**, (6), 405—415, 1943. **(Mucor corymbifer).**

GRIGORALI L., Sénescence et evolution. Cycle du bacille tuberculeux. Impr. de l'Ed. et de L'Industrie Montrouge, 1945.

GRUNBERG E., The fungistatic effects of the fatty acids on species of **Trichophyton.** Proc. of Kentucky-Tennessee branch of the Soc. of the Amer. Bacteriol., **16** nov., 1946; J. of Bacter., **54,** (1), 45, 1947.

GUNCHE F. F. et IAPALUCCI L., Consideraciones a proposito de un caso de favus. Sem. méd., B. Aires, **50,** (2595), 845—847, 1943. **(Achorion schoenleini).**

GWYNNE WALDIN G., The „phenol and camphor" treatment of ringworm of the glabrous skin. An interium report. J. R. Army med. Cps., **81,** (1), 32—34, 1943.

HAGAN W. A., The infectious diseases of domestic animals with special reference to etiology, diagnosis, and biologic therapy. Ithaca, N.Y., Comstock Publishing Co., 1943.

HALL W. E. B., **Actinomyces** in the tonsils. Amer. J. clin. Pathol., **14, (4),** 215—229, 7 fig., 1944.

HALPERT R. and WILKINS H., Méningite mycotique due à un champignon du genre **Candida.,** J. Am. Med. Ass., **130,** (14), 932—934, 1946.

HANKINM A. and SPINNER S., Polmonary moniliasis. Conn. St. med. J., **6,** (4), 264—265, 1942.

HANSEN H. N. and SNYDER W. C., Relation of dual phenomenon in **Penicillium notatum** to penicillin production. Science, New York, **99,** 264—265, 1944.

HARRIS A. M. and PRIESTLY J. B., Actiomycosis. Report of a case with miliary chest lesions. J. Lab. clin. Med., **29,** (8), 815—819, 1944.

HASSID W. Z., BAKER E. E. and McCREADY R. M., An immunologically active polysaccharide produced by **Coccidioides immitis** Rixford and Gilchrist. J. Biol. Chem., **149,** (2), 303—311, 1943.

HATCH W. E. and WELLS A. H., Actinomycosis of the urinary bladder complicating a case of Madura foot., J. Urol., **52,** (2), 149—152, 1944.

HAZEL Jean Hanson, MYERS W. G., STALHY G. L. and BIRKELAND J. M., Variation in **Penicillium notatum** by bombardement of spores with Neutrons. J. of Bacter., Baltimora, **51,** 9, 1946.

HAZEN E. L., Accessory growth substances influencing colony characteristics and macroconidial formation of **Microsporon auduini.** Proc. Eastern New York branch of the Soc. of the Amer. Bacteriol., 6 dec., 1946.

HEATHLEY N. G., JENNINGS M. A. and FLOREY H. W., Antibiotics from **Stereum hirsutum.** Brit. J. of exper. Pathol., **28,** (1), 35—46, 1947.

HEMPHILL J. E. and NOOJIN R. O., North American cutaneous blastomycosis treated with superficial roentgen therapy. A report of four cases. Amer. J. Roentgenol., **48,** (5), 643—650, 1942.

HENDRICKSON G. G. and LEHMAN E. P., Cervicofacial actinomycosis. J. Am. Med. Ass., **128,** 438, 1945.

HENRICI A. T., The Yeasts. Bact. Reviews, **5,** (2), 1941.

HERSH J. H., Primary infection of maxillary sinus by **Actinomyces necrophorus.** Arch. Otoraryngol. Chicago, 41, 204—207, 1945.

HETHERINGTON L. H., Primary aspergillosis of the lungs. Amer. Rev. Tuberc., **47,** (1), 107—108, 1943.

HEVESY G. von and ZERAHN K., The effect of Roengen rays and ultraviolet radiation on the permeability of yeast. Acta radiol., Suéde, **27,** 316—327, **1946.**

HEVIA H., Las tinas del cuero cabelludo. Rev. Med. Chile, **71,** (5), 474—476, 1943. **(Trichophyton** and **Microsporum** spp., **Achorion schoenleini).**

HINDS J. R., Actinomycosis of the liver. Report of a case. N. Z. med. J., **42,** (228, 73—74, 1943.

HITCH J. M., Experimental blastomicosis in mice. J. invest. Derm., **5,** (1), 41—45, 1942. **(Blastomyces dermatitidis).**

HOFF C. L., Immunity studies of **Cryptococcus hominis (Torula histolytica)** in Mice., J. Lab. clin. Med., **27,** (6), 751—754, 1942.

HOLLSTROM E., I funghi nella tubercolosi. Acta med. Scandinavica., aprille, 1945.

HOLLSTROM E., An investigation into a yeast-like fungus isolated from patients suffering from, or suspected of, pulmonary tuberculosis. Acta med. scand., Suppl. **144,** 1943. **(Monilia pinoyi)**

HOLT Rebecca A., The identification of **Blastomycoides histolytica** in three infections of the central nervous system., J. Lab. clin. Med., **26,** (1), 58—62, 1941.

HOLLENBECK W. F. and TURNOFF D., Actinomycosis treated with sulfadiazine. J. Amer. Med. Ass., **123,** (17), 1115—1117, 1943. **(Actinomyces hominis).**

HOPFMANN W., Die Dresch-krankheit. Schweiz. med. Wochscr., **76,** 988—990, 1946.

HOPKINS J. G., HILLEGAS A. B., CAMP E., LEDIN R.B. and REBELL G., Treatmen and prevention of dermatophytosis and relatel conditions., Bull. S. U. Army M. Dept., **77,** 42, 1944.

HORNIBROOK J. W., Streptomycin in experimental plague. Publ. Hlth. Rep. U.S.A., **61,** 535—538, 1946.

HORSH G. F., and ALLEN S. E., A study of the fungus contaminants of the air de San Diego and vicinity. J. Allergy, **16,** 125—135, 1945.

HOTCHKISS R. D., Gramicidin, tyrocidine, and tyrothricin. Advances in Enzymology, **4,** 153—199, 1944.

HUDGINS A. P., Treatment of ringworm infection of female genitalia. W. Va Med. J., **38,** (11), 406—408, 1942.

HUMPHREYS F. A. and HELMER Dorothy E., Pulmonary sporotrichosis in a cathle beast. Canad. J. comp. Med., **7,** (7), 199—204, 1943.

IRIARTE D. R., El carate en Venezuela. Rev. Med. trop., Habana, **8,** (6), 75—81. 1942; **9,** (1), 1—7, 1943. **(Aspergillus nidulans, Fusarium sanguinem, Cephalosporium curtipes, Penicillum cyaneum).**

IRIARTE D. R., Aspergillosis auricular por **Aspergillus fumigatus** Fresenius 1863. Bol Lab. Clin. „Luis Razetti", Caracas, **3,** (10), 176—177, 1943.

IRIARTE D. R., Faringomicosis a **Candida (Monilia) albicans.** Bol. Lab. Clin. „Luis Razetti", Caracas, **3,** (10), 177—178, 1943.

JACOBSON C. E. and DOCKERTY M. B., Blastomycosis of the epididymis: report of four cases. J. Urol., **50,** (2), 237—248, 1943. **(Blastomyces dermatitidis).**

JADASSOHN W., FIEREZ H. E. et HUBER A., Weitere Schultz-Dale'sche Versuche mit Trichophytinen. Dermatologica, Basel, **86,** 17—23, 1942.

JAFFIN A. E., Broncho-pulmonary moniliasis. Case report with pathological study J. Mt. Sinai Hosp., N. Y., **10,** (5), 586—600, 1944. **(Monilia albicans).**

JAMES A. P. R., The fungi go to war. Nev. med. Bull., **41,** (4), 1065—1067, 1943.

JAMIESON R. C. and McCREA Adelia., Ringworm of the fest: shoes and slippers as a source of re-infection. Final report. Arch. Derm. Syph., Chicago, **44,** (5), 837—844, 1941.

JAMS A. M., TENEN M. M. and FLANAGAN H. F., Histoplasmosis. Amer. J. of Dis. Children., **70,** 229, 1945.

JAWETZ E., Dinamics of action of penicillin in experimental animals: observation of mice. Arch. of Internal Med., Chicago, **77,** 1, 1946.

JOHNOSON M. J., Metabolism of Penicillin-producing molds. Ann. New York Acad. Sci., **48,** 57—66, 4 fig., 1946.

JOHNSTON W. A. and KEYDEMANN J., Clinical and pathological studies of pulmanary mycosis. Radiology, **43,** (1), 1—13, 1944. **(Monilia krusei, M. pseudotropicalis).**

JONIS H., RAKE G. and HAMRE D. M., Studies on **Aspergillus flavus.** 1° Biological properties of crude and purified aspergillus acid. J. Bact., **45,** 461—469, 1943.

JONES T. C. and MAURER F. C., A case of sporotrichosis in a Horse. Bull. Army med. Dep., Wash., **74** March, 1944. **(Sporotrichum schencki).**

JOSLYN D. A., YAW Katherine and RAWLINS A. L., Germicidal efficacy of phemerol. J. Amer. pharm. Ass., **32,** (2), 49—51, 1943. **(Actinomyces, Epidermophyton (Trichophyton) rubrum, Microsporum lanosum var. felineum, Monilia (Candida) albicans, T. gypseum asteroides (T. mentagrophytes), T. interdigitalis,** and **T. violaceum).**

JUCKER P., Merfen-Glycerinlösung bei Mundsoor. Schweiz. Med. Wschr., **35,** 929, 1947.

JUCKER S., Penicillina. De Mattia, Ed. Milano, 302 pagg., 1946.

KAROW E. O. and FOSTER J. W., An antibiotic substance from species of **Gymnoascus** and **Penicillium.** Science, New York, **99,** 265—266, 1944.

KEENEY E. L., New drugs for the treatment of fungous infections. Bull. Johns Hopkins Hosp., **74,** (4), 266—268, 1944.

KEENEY E. L., AJELLO L . and LANKFORD E., Studies on common pathogenic fungi and on **Actinomyces bovis.** III. In vitro effect of penicillin. Bull. Johns Hopkins Hosp., **75,** 410—416, 1944.

KEENEY E. L., AJELLO L., BROYLES E. N. and LANKFORD E., Propionate and undecylenate ointments in the treatment of tinea pedis and an in vitro comparison of their fungistatic and antibacterial effects with other ointments. Bull. Johns Hopkins Hosp., **75,** 417, 1944.

KEENEY E. L. and BROYLES E. N., Sodium propionate in the treatment of superficial fungous infections. Bull. Johns Hopkins Hosp., **73,** (6), 479—487, 1943.

KEENEY E. L., SANTORA E. J. and GERMAN Gene. The fungistatic and fungicidal effect of sodium propionate on common pathogens. Bull. Johns Hopkins Hosp., **73,** (5), 379—390, 1943. (Trichophyton purpureum, Epidermophyton inguinale, Microsporum audouini, Candida albicans, Torula histolytica, Coccidioides immitis, Aspergillus flavus, A. fumigatus, Trichophyton gypseum, T. violaceum, E. rubrum, E. interdigitale, T. schoenleini, M. lanosum, Blastomyces dermatitidis, Actinomyces bovis, E. floccosum, D. neoformans).

KELNER A. and HARRY E. MORTON, Two antibiotics (Lavendulin and Actinorubin) produced by **Actinomyces;** 1º Isolation and characteristics of the organism. J. of Bacter., **53,** (6), 695—704, 1947.

KEMPER J. W. and BLOOM H. J., Histoplasmosis, report of a case. J. oral. Surg., **2,** 167, 1944.

KERNOHAN J. W., A new staining method to demonstrate pathogenic yeasts and fungi. J. Neuropath., **2,** (1), 95—98, 1943. **(Debaryomyces neoformans, Coccidioides immitis, Blastomyces hominis, Mucor and Candida spp.)**

KEY J. A. and LARGE A. M., Histoplasmosis of the Knee. J. Bone Jt Surg., **24,** (2), 281—290, 1942.

KLARMANN E. G., SHTERNOV V. A. and COSTIGAN S. M., A method for the evaluation of water soluble and water miscible fungicides used in the prevention of the spread of „Athletes' Foot". J. Bact., **42,** 225, 1941.

KLEINBERG J. and MEYER E., In vitro action of monopyridine iodine p-nitrobenzoate against ringworm fungi. Science, U.S.A., **104,** 398—399, 1946.

KLEY E. C., Skin diseases aboard a destroyer. Nav. med. Bull. Wash., **42,** (2), 407—408, 1944.

KNAYSI G., On the inclusions of **Hansenula anomala.** J. of Bacter., **52,** (4), 487, 1946.

KOCHOLATY W., Cultural characteristics of **Penicillium notatum** in relation to the production of antibacterial substance. J. Bact., **44,** 469—477, 1942.

KOLONJA S., Aktinomykose der weiblichen Genitalorgane. Wiener Klin. Wschr., **58,** 684—686, 1946.

KRAMPITZ L. O., GREEN M. N. and WESMAN C. H., On the mode of action of Penicillin. Proc. of North Central branch of the Soc. of the Amer. en Bacter., 22december, 1946.

KUROTCHKIN T. J., Fungous infections in North China. Proc. sixt Pacif. Sci. Congr. 1939, 815—820, 1942.

KURUNG J. M., The isolation and identification of pathogenic fungi from sputum. Amer. Rev. Tuberc., **46,** (4), 365—391, 1942.

LACAS C. S., Contribuiçao para o estudo dos actinomicetes produtores de micetomas. Tese para o concurso de livre-docência à cadeira de Microbiologia e imunologia de Fac. Med. de Sao Paulo., 1945.

LACAZ C. S., SILVA M. S. e FERNANDES M., Açao da tirotricina „in vitro" sôbre o **Paracoccidioides brasiliensis.** Ensaio terapeutico blastomicose sulamericana. Rev. Bras. Med., **3,** (5), 356—360, 1946.

LADD W. E. and BILL A. H., Actinomycosis of the chest with spread to the abdomen. Report of a case cured with sulfadiazine. New Engl. J. Med., **129,** (20), 748—750, 1943.

LAMAS POUEY E. et BARROS A., Un caso de apendicitis actinomicosica (nota previa). Arch. urug. Med., **20,** (5), 487—493, 1942.

LANDIVAR A. F., LEONI IPARRAGUIRRE C. A., CANESSA L. et PICODUNI R., Actinomicosis generalizada sin lesiones viscerales. Rev. Med., B. Aires, **5,** (8), 567—571, 1943.

LANDY M., SANFORD B. ROSEMAN and WARREN G. H., An antibiotic from Bacillus subtilis active againet pathogenic Fungi. J. of Bacter., **54**, (1), 24, 1947. **(Trichophyton, Epidermophyton, Blastomyces dermatitidis, Nocardia).**

LAW A., Treatment of ringworm of the scalp by synthetic oestrogenic substance, with a note on diagnosis. Med. Pr., **209**, (22), 351, 1943.

LAYMON C. W., Kerion: A Review. Minnesota Med. (St. Paul), **29**, 137, 1946.

LE COMPTE Ph. M. et MEISSNER W. A., Mucormycosis of the central nervous system assiciated with hemochromatosis. The Am. J. of Pathol., **23**, (4), 673—676.

LEITE S., Micetomas. Clin. Hig. Hidrol., **9**, (10), 269—276, 1943.

LEON Y., BLANCO F. et ABALO M. A., Rinosporidiosis: presentacion del primer caso cubano. Revision de la literatura. Rev. Leprol., **1**, (4), 213—229, 1944. **(Rhinosporidium seeberi).**

LEON R., Cromoblastomicosis en Cuba. Villaclara méd., March—April, 228, 1943. **(Hormodendum pedrosoi).**

LEPAGE H. S. et PIZA M. T., Redescriçao do **Neolecanium Silveirai** (Hempel) Seria praga de videria, e seu controle. Arquivos de Inst. Biologico, **12**, 1941.

LERMER P., Seltener Mykosen der Haut. Diss. Erlangen, 1940.

LEVADITI C., La streptomycine. Presse méd., **48**, 656—658, 1946.

LEVAN A., Mititoc disturbances induced in yeasts by chemicals and their significance for the interpretation of the normal chromosome conditions of yeasts. Nature, G. B., **158**, 626, 1946.

LEVENF J., LAMY M., Mer JAMMET et AMADO, Actinomycose thoracique. Traitement por la penicilline. Soc. de Pediatrie, Paris, Seance, 19 Nov., 1946.

LEVIN O. L. and BEHRMAN H. T., The diagnosis and treatment of epidemic ringworm of the scalp. J. Mt Sinai Hosp., **10**, (4), 455—458, 1943. **(Microsporum audouini).**

LEVY B. and BLACK-SCHAFFER B., Studies in experimental systemic mycosis. 1º. Systemic chromomycosis (chromoblastomycosis) in mice: preliminary study. Amer. J. Trop. Med., **25**, (2), 117—127, 1945.

LEWIS G. M. C. and HOPPER M. E., An introduction to medical mycology. The year book publishers, Inc. Chicago, Illinois, Second edition (8), 342 pp., 1 col., 77 figg., 1943.

LEWIS G. M. and HOPPER M. E., Management of dermatophytosis. Southern Med. J., Birmingham, **39**, 246, 1946.

LEWIS G. M. and HOPPER M. E., Concurrent, combined and consecutive fungous infections of the skin. Cultural experiences. Arch. Derm. Syph., Chicago, **47**, (1), 27—35, 1943.

LEWIS G. M. and HOPPER M. E., Ringworm of the scalp. VI. Successful usa of Roentgen rays to epilate local areas of infection. Arch. Derm. Syph. Chicago, **49**, (2), 107—108, 1944. **(Microsporum audouini).**

LEWIS G. M., SILVER S. H., CIPOLLARO A. C., MUSKATBLIT E. and MITCHELL H. H., Measures to prevent and control an epidemie of ringworm of the scalp. N. Y. St. J. Med., **44**, (12), 1327—1333, 1944. **(Microsporum audouini).**

LEWIS W. C. and WYSS O., Biochemistry of Actinomycetes. Proc. of Texas branch od the soc. of the Amer. Bacter., 16 nov., 1946.

LINDSAYY H. C. L., Acute coccidioidomycosis (valley or desert fever). Urol. cutan. Rev., **47**, (12), 692—694, 1943.

LIVINGOOD C. S., ROGERS A. M. et FITZ-HUGH T., Dhobie mark dermatitis. J. Amer. Med. Ass., **123**, (1), 23—26, 1943.

LOBO J., Micetomas podais em Pernambuco. An. Fac. Med. Recife, **8—9**, (8—9), 5—14, 1943. **(Cephalosporium recifei, Acremoniella lutzii).**

LOCHHEAD A. G., CHASE P. E. and LANDERKIN G. B., Production of claviformin by soil penicillia. Canad. J. Res., Sect. E., **24**, 1—9, 1946.

LOHMANN A. J. M., Bronchomycosis. Ned. Tschr. Geneesk. 3240, 1941.

LOHMANN A. J. M., Asthma und Schimmelpilzallergie der Lungen. Ned. Tschr. Geneesk., 66, 1944.

LUBERT M., Actinomycosis of the vertebrae. Amer. J. Roentgenol., **51**, (6), 669—676, 1944.

LUMSDEN L. L. and DEARING W. P., Epidemiological studies on tuberculosis. Am. J. Pub. Health, **30**, 219—228, 1940.

LYLE A. WEED, JAMS A. M. and HADDOW M. KEITH, Histoplasmosis in infancy (The pathologic picture as seen in one case). Arch. of Pathol., **43**, (2), 155—169, 8 fig., 1947.

LYONS C., OWEN Cora R. and AYERS W. B., Sulfonamide therapy in actinomycotic infections. Surgery, St. Louis, **14**, (1), 99—104, 1943.

MACKINNON J. E., Identificaciòn de algunos hongos del género **Aspergillus** aislados en Montevideo. An. Reun. sul-amer. Bot., **2**, 215—232, 1940.

MACKINNON J. E., Zimologia Medica. Vol. 160 pp., 19 tav., Inp. El Siglo Ilustrado, Montevideo, 1946.

MACKINNON J. E. et SCHOUTEN G. B., Investigaciones sobre las enfermedades de los cabellos denominadas „piedra". Arch. Soc. Biol. Montevideo, **10**, (4), 227—266, 1942.

MACKINNON J. E. and ARTAGAVEYTIA-ALLENDE R. C., The so-called Genus **Candida** Berkhout 1923. J. of Bacter., **49**, (4), 317—334, 1945.

MADSEN D. E., Some studies of three pathogenic fungi isolated from animals. Cornell Vet., **32**, 383—389, 1942.

MAGER J., ASCHNER M., Starch reaction as aid in identification of causative agent of european blastomycosis. Proc. Soc. exper. Biol. Med., U.S.A., **62**, 71—72, 1946. **(Torulopsis neoformans, Debaryomyces neoformans).**

MALM M., Changes in the electrical charge of yeasts cells treated with sodium cloride. Nature (G. B.), **157**, 731—732, 1946.

MARCILLA ARRAZOLA J., FEDUCHY MARINO E. et MARQUES GOMES J. V., Contribucion al estudio de levaduras salvajes y cultivadas de las microfloras espanola y portuguesa. Trab. Inst. Cajal, Invest. Biol., Secc. Fisiol. Esp., **3**, 161—191, 1945. **(Torulopsidaceae).**

MARCUSE P. and KAROTKIN L., Review of coccidioidal granuloma in Texas: report of a case. Texxas St. J. Med., **39**, (10), 534—547, 1944.

MARSHALL M. and TEED R. W., **Torula histolytica** meningo-encephalitis: recovery following bilateral mastoidectomy and sulfonamide therapy: preliminary report. J. Amer. Med. Ass., **120**, (7), 527—529, 1942.

MARTIN H. M., Actinomycosis of the Dog and Cat. Vet. ext. Quart. Univ. Pa., **87**, 15—19, 1942.

MARTIN D. S., Studies on the immunologic relationship among various species of the genus **Candida (Monilia)**. Amer. J. trop. Med., **22**, (3), 295—303, 1942.

MARTIN W. P. and SILBER B., Histoplasmosis of Darling (reticulo-endothelial cytomycosis). Case report. Amer. J. clin. Path., **14**, (2), 119—124, 1944.

MARTIRANI I., Consideraçoês sobre um caso de pé de madura e graos vermelhos. Com. ao Dep. Cientifico de CAOC, Sessao de 16 de abril de 1940.

MATHIAS D., Soor des Pausens bei einem Kalbe. Tierartzl. Rundsch., 477—478, 1941. **(Endomyces, Candida albicans).**

MATRAS A., Mykodermien. Wien. klin. Wschr., **56**, (23—24), 386—388, 1943. **(Mycrosporum audouini, Trichophyton** spp., **Epidermophyton inguinale, Achorion schoenleini, A. quinckeanum, M. furfur, Microsporum minutissimum).**

MAYER J. and ASCHNER M., Biological studies on capsulated yeasts. J. of Bacter., **53**, (3), 283—295, 5 figg., 1947.

McCARTHY L,, Tropical mycoses. J. Amer. med. Ass., **123**, (8), 449—454, 1943.

McCLOY A., Actinomycosis of the tongue successfully treated by sulphanamides. Brit. Med. J., (4307), 106, 1943.

McDOUGALL T. G. and KLEIMAN A. H., Prostatitis due to **Coccidioides immitis.** J. Urol., **49**, (3), 472—477, 1943.

McGARVEY W. E., Leptotrichosis conjunctivae. Michigan State Medical Soc.J., (Lansing), **45**, 84, 1946.

MacGREGOR Agnes R. and HENDERSON J. L., Intestinal thrush. A report of two cases in young infants. Arch. Dis. Child., **18**, (96), 186—187, 1943. **(Monilia albicans).**

McHARDY G. and BROWN D. C., Primary bronchial actinomycosis. Sth. med. J., **36**, (10), 674—676, 1943. **(Actinomyces bovis).**

McKENNEY F. D., TRAUM J. and BONESTELL Aileen E., Acute coccidioidomycosis in a Mountain Gorilla (**Gorilla beringeri**) with anatomical notes. J. Amer. Vet. Ass., **104**, 136—140, 1944.

McLEAD J. H., EMMONS C. N. ROSS S. and BURKE G. F., Histoplasmosis: report of 4 cases, 2 in Siblings. Histoplasmine test and other diagnostic procedure. J. of pediatrics. St. Louis, **28**, 275, 1946.

MELENEY H. E., Histoplasmosis (reticulo-endothelial cytomycosis): a review. Amer. J. trop. Med., **20**, 603—616, 1940.

MELLO M. Thiago, AREA LEAO A. E. et CURY A., Cromoblastomicose experimental infecçao generalizada em camondongos. Revista Brasileira de Medicïna, **3**, (5), 347—352, 1946.

MELO N. L. et MELO V. F., Talioterapia. Guatemala Méd., May—June, 15, 1942. (**Trycophyton crateriforme** and **T. acuminatum**).

MERCHANT A. K., Roentgen diagnosis of fungous infections of the gastrointestinal tract. Radiology, **38**, (6), 660—662, 1942.

MERKLE C., Ueber einen mit Irgamid (N_1-Dimethylacroyl-sulfanilamid) geheilten Fall von Aktinomykose der Lunge. Schweiz. med. Wschr., **73**, (40), 1230—1232, 1943.

MEYER E. and ORDAL Z. J., Pathogenicity of **Candida** Species for the Chick Embryo., J. of Bacter., **52**, (5), 615, 1946.

MEZEY C. M. and FOWLER R., Cerebrospinal cryptococcosis. J. Amer. Med. Ass., **132**, 632—634, 1946.

MIALE J. B., **Candida albicana** infection confused with tuberculosis. Arch. path., **35**, (3), 427—437, 1943.

MICHAEL P., McLAUGHLIN R. F., and CENAC P. L., Coccidioidomycosis; report of unsuccessful treatment with penicillin. Nav. Med. Bull., Wash., **43**, (1), 122—124, 1944.

MICHIE W. and BAILIE H. W. C., Un caso di reazione alla penicillina. Brit. Med. J., 21 aprille, 1945.

MIDER G. B., SMITH F. D. and BRAY Jr. W. E., Systemic infection with **Cryptococcus neoformans (Torulo hystolytica)** and **Histoplasma capsulatum** in the same patient., Arch. of Path., **43**, (1), 102—110, 12 figs., 1947.

MIESCHER G. u. BOHM C., Zur Toxikologie des **Penicillium**, Schweiz. Med. Wschr., **77**, (31), 821—826, 1947.

MILIAN N. and THELMA FLANDERS, In vitro responses of **Actinomyces bovis** to sulfonamides and antibiotics., J. of Bacter., **54** (1), 79, 1947.

MOHLER J. R. and SHAHAN M. S., Lumpy jaw, or actinomycosis. Circ. U. S. Dep. Apric., 438, 1943. (**Actinomyces bovis**).

MONTGOMERY R. M. and WALZER Esther A., Tinea capitis with infection of the eyelashes: report of a case. Arch. Derm. Syph., Chicago, **46**, (1), 40—43. 1942. (**Microsporum audouini**).

MONTGOMERY R. M. and CASPER Esther A., Cutaneous manifestation of the Fungi causing dermatophytosis and onychomycosis. J. Am. Med. Ass., **128**, (2), 77—83, 1945.

MONTPELLIER J. et CATANEI A., Nouveau cas de dermatite verruqueuse mycosique observé en Algérie. Arch. Inst. Pasteur Algér., **22**, (1), 13—15, 1944. (**Phialophora verrucosa, Hormodendrum algeriensis**).

MOORE M., The virulence of strains of **Phialophora verrucosa** determined by inoculating chorio-allantoic membranes of chick embryos. J. Invest. Derm., **5**, (6), 411—422, 1942.

MOORE M., Mycotic granulomata of North and South America. Proc. sixth Pacif. Sci. Congr., 1939, 821, 849, 1942.

MOORE M., RUSSEL W. C., SACHS E., Chronic leptomeningitis and ependymitis cause by **Ustilago**, probably **Ustilago zeae** (corn smut) (Ustilagomycosis, the second reported instance of human infection). Amer. J. Pathol., **22**, 761—773, 1946.

MOORE M., COOPER Z. K. and WEIIS R. S., Chromomycosis (Chromoblastomycosis): report of two cases. J. Amer. Med. Ass., **122**, (18), 1237—1242, 1943. (**Phialophora verrucosa**).

MOORE M. and MANTING G., Sporotrichosis following a mosquito bite: description of lesions in a girl of Indian and French descent. Arch. Derm. Syph., Chicago, **48**, (5), 525—526, 1943. (Sporotrichum schencki).

MOORE M. and JORSTAD L. H., Histoplasmosis and its importance to otorhinolaryngologists. A review with report of a new case. Ann. otol., St. Louis, **52**, (4), 779—815, 1943. **(Histoplasma capsulatum, H. pyriforme).**

MORENO G. R. et SOLARI M. A., Asma por Epidermophiton. Prensa med. argent., 30, (24), 1096—1097, 1943. **(Aspergillus glaucus).**

MORRIS G. E., Favus in Massachusset, a report of two cases. New Engl. Med. J., 230, (22), 667—669, 2 figs., 1944. **(Achorion Schoenleini).**

MORROW Marie B. and LOWE E. P., Moulds in relation to asthma and vasomotor rhinitis. Mycologia, **25**, (6), 638—653, 1943.

MORROW M. B., LOWE E. and PRINCE H. E., Moulds fungi in the etiology of respiratory allergic diseases., I. A. survey of air-borne mold., Jour. of Allergy, **13**, (3), 215—226, 1942.

MOTTA L. Da C., Granulomatose paracoccidioidica („blastomycose brasileira"). An. Fac. Med., S. Paulo, **18**, (1), 145—159, 1942. **(Paracoccidioides brasiliensis).**

MOYER A. J. and COGHILL R. D., Penicillin: VIII. Production of Penicillin in surface cultures. J. of Bacter., Baltimore, **51**, 57, 1946.

MOYER A. J. and COGHILL R. D., Penicillin: IX. Laboratory Scale production of Penicillin in submerged cultures by **Penicillium notatum** Westling (NRRL 832). J. of Bacter., Baltimore, **51**, 79, 1946.

MUMFORD E. J. and MOHR J. L., Manual on the distribution of communicable diseases and their vectores in the tropics: Pacific Islands section. Part. I., Amer. J. trop. Med., **24**, (3), 1944. **(Actinomyces minutissimus).**

MURPHY J. M., V. D., and DRAKE C. H., Infection of the Bovine Udder with yeast-like Fungi., American J. of Vet. Research, **8**, (26), 43—51, 1947.

MURPHY L. A., Ringworm of scalp. Med. Ann. of District of Columbia (Wash.) **15**, 64, 1946.

MUSGRAVE A. J., Mould growth on leather. Chem. Industr. (G.B.), (6), 65, 1946.

MUSKATBLIT E., Combined fungous infections. Report of six cases with a review of thirty-six cases from the literature. Arch. Derm. Syph., Chicago, **44**, (4), 631—654, 1941.

NAIDE M., The causative relationship of dermatophytosis to thromboangiitis obliterans. Am. J. Med. Sc., **202**, 822, 1941.

NATHAN H., Primary gastric actinomycosis. Virch. Arch., **273**, 480—495, 1929.

NAUTA A., Sur les elements cellulaires observés dans les mycoses experimentales et humains. So. Franç. de Dermat., Paris, Seance du 19 dec., 1946.

NEGRONI P., Sobre un tipo particular de „onixio blastomicetica". Rev. argent. Dermatosif., **24**, (1), 217—225, 1940.

NEGRONI P., Histoplasmosis de Darling. Thesis Fac. Cien, med., B. Aires, 1940.

NEGRONI P., El problema de las onixis micòticas no especificas. Rev. argent. Dermatosif., **24**, (1), 194—199, 1940.

NEGRONI P., Transformacion „in vitro" del **Rhinocladium schencki** en un cultivo levuriforme. Rev. argent. Dermatosif., **24**, (1), 471—478, 1940.

NEGRONI P., El problema de los dermatofitos. Rev. argent. Dermatosif., **25**, (2), 213—215, 1941.

NEGRONI P., Epidemia de tina en Callos producida por el **Trichophyton flavum.** Rev. argent. Dermatosif., **25**, (3), 363—468, 1941.

NEGRONI P., Reproduccion experimental de la „alopecia parvimaculata". Rev. Inst. bact. Dr. Carlos G. Manbràn, **11**, (1), 109—117, 1942.

NEGRONI P., Dermatomicoses. Diagnostico y tratamiento. Editor Aniceto Lopez. Buenos Aires., 1942.

NEGRONI P., Accion del „factor R" y del acido ascorbico oxidado sobre la reactividad cutanea en le alergia microbiana. Rev. argent. Dermatosif., **27**, (3), 375—382, 1943.

NEGRONI P., Sobre la alergia cutanea em las enfermedades microbianas. Su transmission passiva (Nota previa). Rev. argent. Dermatosif., **27**, (1), 27—29, 1943.

NEGRONI P. et BOSQ P., El granuloma tricofitico de Majocchi es una tricofitide.

Su reproduccion experimental. Rev. Inst. Bact. „Dr. Carlos G. Malbran"., **10,** (4), 472—485, 1942.

NEGRONI P. et DE VILLAFANE LASTRA T., **Trichosporon proteoliticus.** An. Reun. sul-amer. Bot., 1938, **2,** 241, 1940.

NEGRONI P. et FISCHER Ida, Contribucion al conocimiento de la flora alergogena. Prensa med. argent., **30,** (36), 1738—1750, 1943. **(Penicillium).**

NEGRONI P., PIERINI L. et CORDERO A., Alopecia parvimaculata de origen microsporico. Rev. argent. Dermatosif., **24** (3), 250—260, 1940. **(Microsporum felineum).**

NEIMAN B. H. and FAHRNER A. H., Actinomycosis of the ovary. Amer. J. Obst. Gynaec., **45,** (3), 534—538, 1943.

NELSON L. M., Experimental cutaneous reactions of Americans blastomycosis in the Guinea Pig. J. invest. Derm., **5,** (5), 257—267, 1942.

NEVES J. A., Contribuiçao ao estudo dos micetomas em Minas Gerais, Brasil. Maduromicetoma podalico pelo **Monosporium apiospermum** Saccardo 1911. Rev. brasil. biol., **2** (3), 305—316, 1942.

New spray device for athlete's foot control. Soap. N. Y., **20,** (5), 115, 1944.

NICKERSON W. J. and CARROLL W. R., The effect of culture history on the metabolic activities of cells of **Zygosaccharomyces.** J. Cell. comp. Phensiol., **22,** 21—32, 2 figs., 1943.

NICKERSON W. J. and CHADWICK J. B., On the respiration of dermatophytes. Arch. Biochem. U.S.A., **10,** 81—100, 1946.

NICKERSON W. J., IRVING L. and MEHMERT H. E., Effect of wearing sandals in reducing foot infections. Air Surgeons' Bull., **2,** 120—121, 1945.

NICKERSON W. J., IRVING L. and MEHMERT H. E., Sandals, and hygiene and infections of the feet., Arch. of Derm. and Syph., **52,** 365—368, 1945.

NICOD J. L., Hyphomycose (Aspergillose) méningée. Ass. Libre des Pathologistes Suisses, 12⁰ Séance in Berne, 29—30 june, 1946.

NIELSEN J., Dosierungsfragen bei der Roentgenbehandlung von zervicofazialer Aktinomykose. Acta radiol., Stockh., **23,** (3), 303—314, 1948.

NINO F. L., Ulcera micòtica de còrnea. Estudio micològico de una observacion. Bol. Inst. Clin. quir., B. Aires, **19,** 115—132, 1943.

NOEL—HANSON P., Clinical memorandum on tinea infestation. J. R. Army, Med. Cops., **78,** (3), 134—137, 1942.

NOOJIN R. O. and CALLAWAY J. L., Effectiveness in vitro of sulfanamide compounds on **Sporotrichum schencki:** report of five cases of sporotrichosis in North Carolina. Arch. Derm. Syph., Chicago, **49,** (5), 305—308, 1944.

NOOJIN R. O. and CALLAWAY J. L., Action of sulfonamide compounds on **Blastomyces dermatitidis** „in vitro". Arch. Derm. Syph., Chicago, **47,** (5), 620—626, 1943.

NOTTEBROHM T. et NEGRONI P., Queilitis por **Candida suaveolens** (Lindner) Ciferri. Rev. argent. Dermatosif., **24,** (3), 294—298, 1940.

O'DALY J. A., La cromoblastomicosis en Venezuela. Rev. Sanid. Asist. soc. Caracas, **8,** (4), 655—679, 1943. **(Fonsecaea (Hormodendrum) pedrosoi.)**

ODOM G. S., RODENBERG E. J. and SCHAIN P., **Streptomyces (Actinomyces) albus** in the ear. Arch. Otolaryngol., Chicago, **39,** 137—143, 1944.

OLIVEIRA RIBEIRO D., LACAZ C. Da S. et ELEJALDE G., Blastomicose pulmonar pelo **Paracoccidioides brasiliensis.** Ann. paul. Med. Cirurg., **44,** (3), 247—248, 1942.

OLSON B. J., WRIGHT W. H. and NOLA M. O., An epidemiological study of calcified pulmonary lesions in an Ohio country. Pub. Health Rep., **56,** 2105—2106, 1941.

OTTOLENGHI R., The mycotic flora of the oral cavity in normal and pathological conditions. Dent. Items, **66,** (2), 134—138, 1944.
(Saccharomyces hominis, S. glomerulatus, Monilia zeylanica, Aspergillus herbariorum, Sporotrichum sp., Penicillium glaucum).

PALMER Alice E., AMOLSCH A. L. and SHAFFER L. W., Histoplasmosis with mucocutaneous manifestations. Report of a case. Arch. Derm. Syph., Chicago, **45,** (5), 912—916, 1942.

PALMER C. E., Nontuberculous pulmonary calcification and sensitivity to histoplasmin. Pub. Health Rep., **60,** 513—520, 1945.

PANASSENKO V. T., (Toxic and pathogenic moulds) (Russian with English summary). Mikrobiologia, **10,** (6), 762—770, 1941.

PARDO-CASTELLO V., LEON E. R. and TRESPALACIOS F., Chromoblastomycosis in Cuba. Arch. Derm. Syph., Chicago, **45,** (1), 19—31, 1942.

PARODI S. E., BELOU A. P., et BLANCO M. C., Un caso insolito de blastomicosis laringea primitiva causado por **Candida albicans.** Rev. Asoc. argent, **58,** (533), 276—279, 1944.

PARSONS R. J., Experimental histoplasmosis in mice. Arch. Path., **34,** (1), 229—239, 1942.

PARSONS R. J. and ZARAFONETIS C. J. D., Histoplasmosis in Man: report of 7 cases and review of 71 cases. Arch. Intern. med., Chicago, **75,** 1—74, 1945.

PASCHER F., SULZBERGER M. B. and SATENSTEIN D. L., Histologic studies of reactions to intracutaneous tests in allergy of infection in humans. J. Immunol., **46,** (4), 195—206, 1943. **(Trichophyton interdigitale, Monilia albicans).**

PASTERNACK J. G., Subacute **Monilia** endocarditis: a new clinical and pathologic entity. Amer. J. Clin. Path., **5,** (12), 496—505, 1942.

PASTERNACK J. G. and ALEXANDER C. S., Rhinosporidiosis in Texas. Tex St. J. Med., **38,** (4), 285—288, 1942. **(Rhinosporidium seeberi).**

PATOCKA F. et REQUES V., Stude d'une nouvelle espécie anaerobie **Leptotrichia vaginalis** n. sp. Soc. Franç. de Microbiol. Séance 6 janvier 1947. (La presse méd., 21, 1947.)

PAULETTA G., Sulle sostanze antibiotiche. V° Fattori che influenzano la produzione di penicillina da parte di un ceppo di penicillo. Il Farmaco, **1,** (2), 89—101, 1946.

PECK S. M., Fungus allergy and industrial dermatitis. J. ind. Med. Ass., **37,** (6), 304—306, 1944. **(Tricophyton mentagrophytes).**

PECK S. M., BOTVINICK I. and SCHWARTZ L., Dermathophytosis in Industry. Arch. Dermat. and Syph., **50,** (3), 170—178, 1944.

PECK S. M. and HEWITT W. L., The production of an antibiotic substance similar to penicillin by pathogenic fungi (dermatophytes). Publ. Health Rep. U.S.A., **60,** 148—153, 1945.

PECK R. L., HOFFHINE C. E. Jr., PEEL E. W., GRABER R. P., HOLLY F. W., MONZIGO R., FOKERS K., Streptomyces antibiotics. VII: The structure of streptodine. J. Amer. Chem. Soc., **68,** 776—781, 1946.

PECK R. L., WALTI A., GRABER R. P., FLYNN E., HOFFHINE C. E. Jr., ALLFREY V., FOLKERS K., Streptomyces antibiotics: VI: Isolation of streptothricin. J. Amer. Chem. Soc., **68,** 772—776, 1946.

PECK S. M. et SCHWARTZ L., Plan practico para el tratamiento de las micosis superficiales. Boll. Ofic. Sanit. pan-amer., **22,** (3), 205—213, 1943.

PECK S. M. and SCHWARTZ L., A pratical plan for the treatment of superficial fungus infections. Publ. Hlth. Rep., Wash., **58,** (9), 337—345, 1943.

PEPPLE A. and FOWLKES R. W., Some recent advances in diagnosis and treatment of cutaneous fungous infections. Virginia Med. Mon., **70,** (2), 101—104, 1943.

PEPPLER H. J. and TWIEHAUS M. J., Equine sporotrichosis. Trans. Kans. Acad. Sci., **45,** 40—46, 1942. **(Sporotrichum schencki, S. jenselmei).**

PEPPLER H. J., Routine procedures for the isolation and identification of certain pathogenic fungi. Amer. Clin. Pathol., tech. Sct., **13,** (11), 123—127, 1 tabl, 1943,

PERRIN G. et BAEZ M. M., Note sobre el primer caso de histoplasmosis en Méjico. Rev. Clin. esp., Madr., **9,** (6), 396—401, 1943.

PERYASSU' D., Sulfamidoterapia de blastomice brasiliera. An. brasil. Derm. Sif., **17,** (4), 261, 1942.

PETERSON V. L., Fungus disease of the chest. Radiology, **43,** (1), 14—20, 1944. **(Coccidioides immitis, Aspergillus, Monilia albicans, Debaryomyces neoformans).**

PILLSBURY N. R. and WASSERSUG J. D., Pulmonary actinomyvosis: treatment with sulfonamides. New Engl. J. Med., **230,** (3), 72—74, 1944. **(Actinomyces hominis).**

PIMENTEL IMBERT M. F., Broncomoniliasis. Reporte de un caso fatal. Rev. Med. trop., Habana, **9**, (2), 16—18, 1943.

PINETTI P., Studi sulla biologia dei Dermatomiceti. I. Capacità di assimilazione dell' azoto e attività proteolitiche di alcuini Dermatomiceti. Boll. Soc. Ital., Biol. Sper,. **22**, (6), 1946.

PINETTI P., Studi sulla biologia dei Dermatomiceti. II. Capacità di assimilazione degli idrati di carbonio ed attività fermentative glicolitiche di alcuni Dermatomiceti. Boll. Soc. Ital. Biol. Spar., **22**, (6), 1946.

PINSCHMIDT N. W. and LEVY B., A simple method for the routine search for antibiotic substances produced by molds. J. Pharmacol. exper. Therap. U.S.A., **82**, **19—22, 1944.**

PIORKOWSKI F. O., Some aspects of fungous disease of the skin. E. Afr. med. J., 20, (10), 333—346, 1943.

PIPER J. E., A case of torulosis. Med. J. Aust., **31**, (20), 141, 1944. **(Torula histolytica, Debaryomyces neoformans).**

PIRATININGA S. N., Esporotricose em Muar. Rev. Fac. Med. vet. S. Paulo., **2**, (3), 219—222, 1943. **(Sporotrichum beurmanni).**

POLLARD A. L., Thermal schock in the isolation of **Streptomyces.** Proc. of Kentucky-Tennessee branch of the Soc. of the Amer. Bacter., 16 nov., 1946.

PONTECORVO G., Assay of the Rates of secretion of antibiotic in different regions of a growing mould colony. Nature, **155**, 515, 1945.

PONTECORVO M., Produzione di penicillina: relazione dei ceppi e terreni di coltura. Il Progresso Medico, **2**, (8), 237—239, 1946.

POPPE K. J., Traitement de l'Actinomycose pulmonaire avec un compte-rendu de 7 cas. The J. of Thoracis Surg., **15**, (2), 118—126, 1946.

PRADER F., Die Hefebesiedelung der Mundhöhle. Actes. Soc. helv. Sci. nat., **125**, 211 —212, 1945.

PRATT H. N. and CROSSMAN Ruth., The comparative atopic activity of **Alternaria** spores and mycelium. J. Allergy., **13**, (3), 227—230, 1942.

PRESCOTT S. C. and DUNN C. G., Industrial microbiology., McGraw—Hill Book Co., New York and London, 1940.

PRUNES L. et FREY J. R., Cromoblastomicosis. Rev. argent. Dermatosif., **26**, (4), 1200—1205, 1942. **(Monilia (Candida) albicans, Rhodotorula, Phialophora verrucosa** and **Acrotheca (Hormodendrum) pedrosoi).**

QUAGLIARIELLO G., Sulla costituzione chimica delle penicilline. Il Farmaco, **1**, (2), 131—135, 1946.

QUILL L. M. and BURCH J. C., Surgical manifestation of coccidioidomycosis. Ann. Surg., **120**, (4), 670—679, 1944.

RAE M. Viola., A case of obscure pulmonary infection. Observations on lung infection roentgenologically tuberculous but bacteriologically yielding a pathogenic yeast and non-pathogenic acid-fast bacillus. Canad. J. publ. Hlth., **34**, (5), 241 244, 1943. **(Monilia (Candida) albicans).**

RAKOFSKY M. and KNICKERBOCKER T. W., Roentgenological manifestations of primary pulmonary coccidioidomycosis. Amer. J. Roentgenol., **56**, 141—155, 1946.

RAMON G., GIRARD G. et RICHON R., De influence sur toxine pesteuse des filtrats de culture de **B. subtilis**, de **Penicillium notatum, d'Actinomyces griseus.** Acad. Sci. Paris, Seance, 5 Mai, 1947.

RAMON G., LEVADITI C., RICHON R. et HENRY J., Des proprietés antidotiques des filtrats de culture d'**Actinomyces griseus;** leurs characteristiques principals. Acad. des Sci. Paris, Séance 6 Janvier, 1947.

RAMON G. et RICHON R., Sur une méthode d'évaluation des propriétés antidotiques des filtrats de cultures de germes antagonistes **(Penicillium notatum, Actinomyces griseus, B. subtilis**, etc.). Ac. des Sci. Paris, Seance 17 feb., 1947.

RAMSEY T. L. and APPLEBAUM A. A., Histoplamosis „Darling". Amer. J. clin. Path., **12**, (2), 85—94, 1942.

RAMON G. et RICHON R., Les complèxes antagonistes des filtrats de **Penicillium notatum, d'Act. griseus,** de **B. subtilis** et leur action „in vitro" sue le virus vaccine. Acad. des Sci. Paris, Seance 12 mai. 1947.

RAPER K. B., The development of improved penicillin-producing molds. Ann. New York Acad. Sci., **48**, 41—52, 1946.

RAPER K. B., Variation in Molds. Natural and induced. Proc. of Illinois branch of the Soc. of the Amer. Bacter., 17 january, 1947.

RAY L. F. and ROCKWOOD E. M., Sporotrichosis. Report of a case in which it was resistant to treatment. Arch. derm. Syph., Chicago, **46**, (2), 211—217, 1942.

RAYNER M., Fungous infection of the foot. J. Amer. med. Ass., **124**, (12), 751—756, 1944.

REBOUL J. A., Action des antireptiques sur les Levures. Rec. Trav. Inst. nation. Hyg., **2**, (1), 309—314, 1945.

REDAELLI P., Introduzione allo studio degli antagonismi microbici. Il Farmaco, **1**, (2), 121—130, 1946.

REID J. D., SHERER J. H., HERBUT P. A. and IRVING H., Systemic histoplasmosis. Systemic histoplasmosis diagnosed before death and produced experimentally in Guinea Pigs. J. Lab. clin. Med., **27**, (4), 419—434, 1942.

REISS F., Successful inoculations of animals with **Trichophyton purgureum**: observations on the course of the disease and immunologic and histologic features. Arch. Derm. Syph., Chicago, **49**, (4), 242—248, 1944.

RIBEIRO D. O., LACAZ C. Da S. et ELEJALDE G., An. paul. Med. Cirurg., **44**, September, 1942. **(Paracoccidioides brasiliensis).**

RICHARDS W. O., Growth of Bacterial and fungal colonies as seen with the phare microscope. J. of Bacter., **54**, (1), 4, 1947.

RIGMOR von Magnus, Biochemical aspects of **Actinomyces** of group II⁰ B (Ørskov) isolated from human throat. Acta pathol. et Microb. Scandinavica, **24**, (1), 11—32, 1947.

ROBBINS W. S., HERVEY A., DAVIDSON R. W., MA R. and ROBBINS W. C., A survey of some wood-destroying and other fungi for bacterial activity. Bull. Torrey bot. Club. U.S.A., **72**, 165—189, 4 fig., 1945.

ROBBINS W. J., KAVANAGH F. and HERVEY A., Production of antibiotic substances by Basidiomycetes. Ann. New York Acad. Sci., **48**, 67—72, 1946.

ROBINSON R. A., Actinomycosis of the subcutaneous tissue of the forearm secondary to a human bite. J. Amer. med. Ass., **124**, (15), 1049—1051, 1944. **(Actinomyces bovis).**

RODE L. J ., FOSTER J. W., LACY H. and SCHUHARAT V. T., Panicillin production by a thermophylic fungus. Proc. of Texas branch of the Soc. of the Amer. Bacter., 16 nov., 1946.

RODHAIN J., Quelques données au sujet des teignes au Mayumbe. Ann. Soc. belge Med. trop., **23**, (1), 63—66, 1943. **(Achorion Schoenleini, Trichophyton soudanense).**

ROGERS R. E., HIRSCHMANN D. J. and HUMFELD H., Comparison of growth of **Trichophyton interdigitale** on wool fabric with and without additional nutritive media. Proc. Soc. exp. Biol., New York, **45**, 729—733, 1940.

ROGERS F. S., Vulvovaginal mycosis. Amer. J. Obstet. Gynaec., **46**, (3), 450—452, 1943. **(Monilia, Candida).**

ROSEBURY T., The parasitic Actinomycetes and other filamentous microorganisms of the mouth. A review of their characteristics and relationship, of the bacteriology of actinomycosis, and of salivary calculus in Man. Bac. Rev., **8**, 189—233, 1944.

ROSEBURY T., EPPS Lillian J. and CLARK Ada R., A study of the isolation cultivation and pathogenicity of **Actinomyces israeli** recovered from the human mouth and from actinomycosis in Man. J. Infect. Dis., **74**, (2), 131—149, 1944.

ROSENBAUM Elizabeth H., The development and systematic position of **Arachniotus trisporus.** Ann. Mo. bot. Gdn., **31**, (2), 173—200, 1944. **(Arachniotus trisporus, Gymnoascus sudans).**

ROSENBERG E. F., DOCKERTY M. B. and MEYERDING G. H. W., Coccidioidal arthritis: report of a case in which the ankles were involved and the condition was unaffected by sulfanilamide and Roentgen therapy. Arch. intern. Med., **69**, (2), 238—250, 1942.

ROSENTHAL S. R. and ROUTIEN J. B., The infectiousness of coccidioidomycosis. Science, U.S.A., **104,** 479, 1946.

ROSENVOLD L. K., Dacryocystitis and blepharitis due to infection by **Aspergillus niger:** report of cases. Amer. J. Ophthal., **25,** (3), 588—589, 1942.

ROSSETTI N., Contribuiçao para o estudo do **Achorion gypseum** Bodin, 1907. Quatro casos observados em S. Paulo. Arch. Derm. Syph., S. Paulo, **3,** (1—2), 3—45, 1939.

SAGLAM T., Histoplasmosis. Schweiz. med. Wschr., **76,** 1153—1156, 1946.

SAIBENE G., Considerazioni etiologiche e patogenetiche su tre casi di „nigrities linguae". Lo Sperimentale, **98,** (1—2), 1946. **(Monilia, Cryptococcus hominis).**

SALVIN S. B., An antifungal substance from a strain of **Aspergillus flavus.** J. of Bacter., **52,** (5), 614, 1946.

SALVIN S. B., Cultural studies of the yeastlike phase of **Histoplasma capsulatum** Darling. J. of Bacter., **54,** (1), 30, 1947.

SAMPSON B. F. and FARREN J. E., Another case of **Torula** meningitis. S. Afr. med. J., **16,** (13), 245—247, 1942.

SARTORY A., Etude d'un **Actinomyces** chromogéne. C. R. Acad. Sci. Paris, **214,** (15), 723—724, 1942. **(Actinomyces violaceus).**

SARTORY A. et SARTORY R., Etude d'un **Acremonium nouveau,** agent d'une affection gommeuse, **Acremonium cinnabrium** n. sp. C. R. Acad. Sci. Paris, **216,** (11), 389—391, 1943.

SARTORY A. et SARTORY R., Un **Aspergillus** pathogéne nouveau, **Aspergillus septatus** n. sp. C. R. Acad. Sci. Paris, **216** (12), 426—428, 1943.

SARTORY A., SARTORY R. et KOCHER F., Une dermatomycose fréquente des veaux causée per une espèce du genre **Trichophyton.** C. R. Acad. Sci. Paris, **216,** (16), 578—579, 1943.

SARTORY A. et BAILLY C., Actinomycose renale. Acad. Sci. Paris, Seance, 2 juin, 1947.

SAUCHER G., BOYER F., GRUMBACH F. et LAMENSAUS A., Production de penicilline par culture d'un **Penicillium chrysogenum** sur les milieux à base de lacto-serum. Soc. franç. de Microbiol., Séance 9 Janvier, 1947.

SAYER A., Blastomycosis of the skin (Gilchrist type) with associated blastomycetic pulmonary disease; report of a case. Nav. med. Bull., Wash., **43,** (2), 333—342, 1944. **(Blastomyces dermatitidis).**

SCHATZ A., WAKSMAN S. A., Strain specificity and production of antibiotic substances. IV: Variations among Actinomycetes, with special reference to **Actinomyces griseus.** Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., **31,** 130—137, 5 tabl., 1945.

SCHATZ A., MAGNUSON H. J., WAKSMAN S. A. and EAGLE H., Isolation of an antibiotic agent derived from a **Phycomyces** active in vitro against **Trypanosoma equiperdum.** Proc. Soc. exper. Biol. Med. U.S.A., **62,** 143—145, 1946.

SCHENKEN J. R. and PALIK E. E., Coccidioidomycosis in States other than California, with report of a case in Louisiana. Arch. path., **34,** (3), 484—494, 1942.

SCHLUMBERGER H. G. and SERVICE A. C., A case of histoplasmosis in an infant with autopsy. Amer. J. med. Sci., **207,** (2), 230—239, 1944.

SCHOPFER W. H. et BLUMER S., Recherches sur le besoin en facteurs de croissance vitaminiques et le pouvoir de synthèse d'un **Trichophyton.** Le problème du conditionnement des pouvoirs de synthèse. C. R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève, **54,** (2), 106—112, 1942. **(Trichophyton album).**

SCOLARI P. G., RECHTER M. et DECOUD A. C., Sicosis tricofitica de la barba de comienzo atipico. Rev. argent. Dermatosif., **27,** (1), 92—97, 1943.

SCOTT E. G., Streptomicin: Review of literature. Delaware State medical J. Wilmington, **18,** 15, 1947.

SEALE W. H., FLINN C. B. and BRITT E. C., Rhinosporidiosis. Arch. Otolaryngol., **40,** (3), 203—205, 1944. **(Rhinosporidium seeberi).**

SEGRETAIN G., Sur un **Trichophyton rubrum d'origine** africaine. Soc. franç. de Microbiol., Seance du 10 oct., 1946.

SEGRETAIN G., Etude de la maladie expérimentale d'un lapin provoquée par un **Candida albicans,** agent probable d'une mycose pulmonaire. Soc. franç. de Microbiol., Seance 9 janvier, 1947.

SERRANO M., Ueber die Systematik von 18 aus verschiedenen Krankheits prozessen der menschlichen Haut gewonnen Sprosspilzen. Z. Parasitenk., **12**, (1), 1—35, 1940.

SERRANO M., Beitrag zur Systematik pathogener Sprosspilze. Zbl. Bakt., **147**, (2), 98—104, 1941.

SHAHAN M. S. and DAVIS C. L., The diagnosis of actinomycosis and actinobacillosis. Amer. J. vet. Res., **3**, 321—329, 1942.

SHANKS S. C., Xray treatment of ringworm of the scalp. Mon. Bull. Minist. Hlth., London, **3**, (11), 188—191, 1944.

SHAW F. E., STRAWSON E. and MAY H. B., L'esame batteriologico del canale infetto e l'uso della penicillina. Brit. Med. J., 21 aprile, 1945.

SHAW C., Dermatitis due to shoes. Arch. Derm. Syph., Chicago, **49**, (3), 191—193, 1944.

SHAW F. W. and VON GUTFELD F. J., Longevity of fungi on carriers. Virginia med. Mon., **71**, (5), 256—257, 1944. **(Trichophyton gypseum, Microsporum audouini, M. lanosum).**

SHEARBURN E. W., Actinomycosis of stomach and duodenum: report of two cases. Surgery, St. Louis, **14**, (1), 38—46, 1943.

SHERWOOD M. B., FALCO E. A. and DE BEER E. J., Factors influencing the speed and accuracy of a simple quantitative assay method of testing antibiotic substances. J. Bact., **47.**, 18, 1944.

SHERWOOD M. B., FALCO E. A. and DE BEER E. J., A rapid quantitative method for the determination of penicillin. Science, **99**, 247—248, 1944.

SHOPPER W. H. et BLUMERS S., Zur Wirkstoffphysiologie von **Trichophyton album** Sab. Ber. Schweiz. bot. Ges., **53**, 406—465, 1943.

SIGALOS P., Die chirurgischen Mykose in Griechenland. Dtsch. Z. Chir., **257**, (5—6), 303—315, 1943.

SIGNORELLI S., Sulfamidici e penicillina nell'actinomicosi. Il Progresso Medico, **1**, (18), 1945.

SIGNORELLI S., Contributo clinico alla conoscenza delle correlazioni somato-viscerali in campo immun-biologico (a proposito di un caso di actinomicosi polmonare). Il Progresso Medico, **3**, (8), 228—232, 1947.

SIGNORELLI S., Considerazioni sulla fisiopatologia della actinomicosi umana a proposito del meccanismo d'azione della cura sulfamidica e penicillinica. Soc. Nap. Chir., Seduta del 21.12.1945.

SILVER S. H., **Microsporon audouini** infection of the eyelashes. Arch. Derm. Syph., Chicago, **49**, (6), 436, 1844.

SIMSON F. W. and BARNETSON J., Histoplasmosis: report of a case. J. Path. Bact., **54**, (3), 299—305, 1942.

SIMSON F. W., HARINGTON C. and BARNETSON J., Chromoblastomycosis: a report of six cases. J. Path. Bact., **55**, (2), 191—198, 1943.

SIMSON F. W., Chromoblastomycosis, some observations on the types of the disease in South Africa. Mycologia, U.S.A., **38**, 432—449, 1946. **(Hormodendron Pedrosoi var. cladosporium).**

SKEER J., Sporotrichosis. Report of a case of localized lymphatic type originating in New Yorkk City. Med. Times, N.Y., **71**, (1), 7—11, 1943.

SKINNER C. E., EMMONS C. W. and TOUCHIYA H. M., Henrici's Molds, yeasts and Actinomycetes. Second Ed. pags. 409, 136 figs. J. Wiley and Sons, New York, 1947.

SKOOG F. K. and LINDGREN C. C., Adaptation in a Yeast unable to ferment glucose. J. of Bacter., **53**, (6), 729—742, 1947.

SMITH C. E., Coccidioidomycosis. Med. Clin. of North America, **27**, (3), 790—807, 4 fig., 1943.

SMITH C. E., Parallelism of coccidioidal and tuberculous infections. Radiology, **38**, (6), 643—648, 1942.

SMITH F. D., A. case of lung infection with **Aspergillus fumigatus.** J. Bact., **45**, (1), 97. 1943.

SMITH G., Recent progress in industrial mycology. Sci. Progr. G. B., 34, 670—680, 1946.

SMITH G., An introduction to industrial mycology. 30 Ed. London, E. Arnold and Co. 1946, XIV—271 pp., 37 pl.

SMITH M., Ringworm of the scalp. Mon. Bull. Minist. Hlth, London, **4,** (10), 168—170, 1944. **(Microsporum audouini).**

SMITH R. T., Actinomycosis of the liver and lungs. Amer. J. Surg., N.S., **60,** (3), 438—442, 1943.

SNEDDON I. B., Epidermophyton infections of the skin. J. R. nav. med. Serv., **28,** (2), 154—160, 1942. **(Epidermophyton (Trichophyton) interdigitale, E. inguinale.)**

STEVEN R. A. and WILLIAMS O. O., Actinomycotic infections of the soft tissues of the neck; apparent cure following large dosis of penicillin. J. Lab. clin. Med., **30,** 509—511, 1945.

STILES C. W. and DAVIS C. L., Coccidioidal granuloma (coccidioidomycosis). Its incidence in man and animals and its diagnosis in animals. J. Amer. med. Ass., **119,** (10), 765—770, 1942.

STOGER H., Die fadenbakteriellen Entzündungen im Mund- und Kieferbereich. Wiener klin. Wschr., **58, 610—615,** 1946.

STOKES J. L., PECK R. L. and WOODWARD R. C., Antimicrobial action of pyocyanine, hemipycyanine, pycyanase, and tyrothricin. Proc. Soc. exp. Biol. e Med., **51,** (1), 126—130, 1942.

STOKES J. H., LEE W. E. and JOHNSON H. M., Contact, contact-infective and infective-allergic dermatitis of the hands, with special reference to rubber glove dermatitis. J. Amer. med. Ass., **123,** (4), 195—202, 1943.

STONE R. W. and FARREL M. A., Mezzi sintetici di cultura per la produzione della penicillina. Science, **104, 445, 1946.**

STRAUSS S. D., **Trichophyton** foot infections. Empirical study of camphorphenol treatment. Milit. Surg., **91,** (3), 348—349, 1942.

SUBBA REDDY D. V., Incidence of skin disease in Vizagapatam (South India). Indian J. vener, Diss. Derm., **10,** (1), 1—8, 1944.

SULZBERGER M. B., BAER R. L. and HECHT R., Common Fungous Infections of the feet and groins. Arch. Derm. e Syph., **45, 670,** 1942.

SUTPHIN A., ALBRIGHT F. and McCUNE D. J., Five cases (three in sibling's) of idiopatic hypoparathyroidism associated with moniliasis. J. clin. Endocrin., **3,** (12), 625—634, 1943. **(Monilia albicans).**

SWANSON H. S. and SMITH W. A., Torular granuloma simulating cerebral tumor: report of two cases. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago, **51,** (5), 426—431, 1944.

SWARTZ J. H., Elements of medical mycology. 179 pp., New York, Grune and Stratton, Inc., 1943.

SYMMERS D., Experimental reproduction of maduromycotic lesions in rabbits. Arch. Pathol., Chicago, **39, 358—363,** 1945. **(Phialophora** de Janselme).

SYMMERS D. and SPORER A., Maduromycosis of the hand, with special reference to heretofore undescribed foreing body granulomas formed around disintegrated chlamydospores. Arch. Path., **37,** (5), 309—318, 1914 (Madurella).

TAGER M. and LIEBOW A. A., Intranasal and intraperitonaal infections of the mouse with **Coccidioides immitis.** Yale J. Biol. Med., **15,** (1), 41—59, 17 figs., 1942.

TAYLOR A. W., Actinobacillosis in sheep. J. Comp. Pathol. Therap., G. B., **54,** 228—237, 1944.

TAYLOR S. J., A simple treatment for epidermophytosis. Milit. Surg., **91** (1), 93—96, 1942.

TELLO D. A. et TELLO E., Pie de Madura a granos negros (observacion clinica). Rev. argent. Dermatosif., **27,** (1), 80—85, 1943.

THAYSEN A. C. and BUTLIN K. R., Inhibition of the development of **Fusarium oxysporum cubense** by a growth substance produced by „Meredith's" **Actinomyces.** Nature, London, **156,** 781—782, 1941.

The first case of Madura foot in Palestine. J. Amer. med. Ass., **122,** (1), 54, 1943.

THOM C. and RAPER K. B., A manual of the Aspergilli, vol. VII—IX, 1—373, **76** fig., 1945. The Williams and Wilkins company, Baltimore.

THOMAS W. C. and MOREHEAD R. P., Histoplasmosis: report of a case in North Carolina. N. C. Med. J., **4,** (9), 378—382, 1943.

THOMPSON K. W., Studies on the relationship of dermatomycosis to ulceration and gangrene of the extremities. Yale J. Biol. and Med. **16,** 665, 1944.

THOMPSON K. W., The skin-reaction antigen of **Trichophyton purpureum.** J. invest. Derm., **5,** (6), 475—480, 1942.

THORNE R. S. W., Recent works on the nitrogen nutrition of yeast. J. Instit. Brewing, G. B., **51,** 114—126, 1945.

THORNE R. S. W., A yeast growth inibitive effect exhibited by tyrosine and glycine. J. Inst. Brew., G. B., **52,** 15—16, 1946.

THURINGER J. M., Histoplasmosis: report of its occurrence in a Dog., Arch. Path., **37,** (2), 140—142, 1944.

TILL A. S., Acute miliary actinomycosis following perforated gastric ulcer. Brit. J. Surg., **34,** 93—95, 4 fig., 1946.

TOMB J. W., The treatment of tinea (dhobie's itch). J. trop. Med. (Hyg)., **46,** (1), 6, 1943.

TOMPPERT H., Die durch Schimmelpilze verursachten Erkrankungen unserer Haustiere. Inaug. Diss., Hannover, 1940.

TONELLI L., L'actinomicosi dell'utero. Arch. De Vecchi, **7** (3), 823—842.

TOOP C. R., Mycotic dermatitis („lumpy wool") and fleece rot of Sheep. J. Dep. Agric. W. Aust., **20,** (4), 319—322, 1943. **(Actinomyces dermatonumus, Pseudomonas aeruginosa).**

TORLET M. J., Abces actinomycosique du sein. Soc. franç. de Gynécol., Seance du 20 janvier, 1947.

TORLET J., GRIGANT et ISADOR, Un cas de sporotrichose génitale. Soc. franç. de gynécologie, Séance du 17 fevrier, 1947.

TORNELL E., Thresher's lung. A fungoid disease resembling tuberculosis or morbus Schaumann. Acta med. scand., **125,** (3), 191—219, 1946.

TORNELL E., Ar lymphogranulomatosis benigna en svampsjukdom? (E' la linfogranulomatosi benigna una micosi?). Nord. Med., **31,** 2149—2154, 1946.

TRAUM J. and SCHALM O. W., Actinomycetic-like clubs associated with coccidioidal granuloma in cattle. Proc. 6th Pacif. Sci. Congr., 1939, 873—876, 1942.

TREJOS W. A. J., Caso de micosis pulmonar tomado por tuberculosis. Rev. méd., S. José, **5,** (93), 85—89, 1942.

TRITTO G., La penicillina, la sulfodiazina ed il trattamento chirurgico delle micosi polmonari. Soc. Napoletana di Chirur., Seduta del 3 genn., 1946.

TRUSSEL P. C., FULTON C. O. and GRANT G. A., Two antibiotics produced by a **Streptomyces.** J. of Bacter., **53,** (6), 769—780, 1947.

TULIPAN L. and MUSKATBLIT E., Generalized moniliasis with proved pathogenecity. Report of a case. Arch. Derm. Syph., Chicago, **46,** (5), 643—650, 1942. (Monilia albicans).

TULLIS J. L. and MORVIN O. E., Human necrobacillosis with report on death of a sailor. Amer. J. clin. Pathol., **16,** 395—400, 1 fig., 1946.

TUNG P. C. and CHEN J. H., Actinomycosis of the face, with report of a case successfully treated with lymph glan extract. Chin. med. J., **61,** (1), 12—13, 1942.

TUNNICLIFF E. A., A study of **Actinobacillus ligneresi** from sheep affected with actinobacillosis. J. infect. Dis., U.S.A., **89,** 52—58, 1941.

VAISMAN A., VAISMAN—NOURRY H. and HENZY J., Action antibiotique du **Penicillium chloro-phoenum** Biourge. C. R. Soc. Biol., FR., **140,** 356—357, 1946.

VALIENTE J. F. et BLANCO SOLIS A., Un caso de actinomicosis pleuro-pulmonar. Mem. Congr. méd. centr-amer., San Salvador, 1938, 417—429, 1942.

VAN DER SAR H. and HARTZ P. H., Mycetoma pedis: case report. Am. J. of Clin. Pathol., Baltimore, **16,** 129, 1946.

VAN PERNIS P. A., BENSON M. E. and HOLINGER P. H., Specific cutaneous reactions with histoplasmosis. J. Am. Med. Assoc., **117,** 436—437, 1941.

VAN PERNIS P. A., BENSON Miriam E. and HOLINGER P. H., Laryngeal and systemic histoplasmosis (Darling). Ann. intern. Med., **18,** (3), 384—393, 1943. **(Histoplasma capsulatum).**

VAYLES G. Q. and BECK E. M., Infection du système nerveux due à **Torula hystolitica (Cryptococcus hominis).** 1°. Rapport de 4 cas et revue de la litérature. Arch. Intern. Med., **77,** (5), 504—515, 1946.

VERSIANI O., Blastomicosa. Rev. Brasil. Biol., **5,** (1), 1945.

VIEGAS A. P., Notas sobre uma nova especie de Sporosmia. Bragantia, **3,** (7), 155—164, 1943.

VIEGAS A. P., Notes sobre tres fungus grasileiros. **Piedraia Hortai** (Brumpt) Fonseca et Area Leao. Bragantia, **3,** (3), 31—48, 1943.

VINK H. H., Mucor mycosis in a Pig. Tijdschr. Diergeneesk., **68,** 312—315, 1941.

VIRTANEN O. E., Penisilliini. Suomen Kemistil (Helsinski), **19,** (3), 27—37. 1946.

VOLK R. et CANAS E., Un caso de blastomicosis. Medicina Méx., **22,** (426), 615—623, 1942.

WADE L. J. and STEVENSON L. D., Torula infection. Yale J. Biol. Med., **13,** 467—476, 1941. **(Debaryomyces neoformans).**

WAKSMAN S. A. and BUGIE E., Strain specificity and production of antibiotic substances. II: **Aspergillus flavus oryzae** group. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A., 29, 282—288, 1943.

WAKSMAN A. S., GEIGER B. W. and BUGIE E., Micromonosporin, an antibiotic substance from a little-known group of microrganisms. J. of Bacter., **53,** (3), 355—357, 1947.

WAKSMAN S. A., GEIGER W. B. and REYNOLDS D. M., Strain specificity and production of antibiotic substances. VII: Production of antinomycin by different Actinomycetes. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A., **32,** 117—120, 1946.

WAKSMAN S. A. and HENRICI A. T., The nomenclature and classification of Actinomycetes. J. Batc., **46,** 337—341, 1943.

WAKSMAN S. A., HORNING E. S. and SPENCER E. L., Two antagonistic fungi: **Aspergillus fumigatus** and **Aspergillus clavatus** and their antibiotic substances. J. Bacter., **45,** 233—248, 1943.

WAKSMAN S. A. and REILLY H. C., Bactericidal action of antibiotic substances. J. Infect. Dis., **75,** 150—159, 1944.

WAKSMAN S. A. and SCHATZ A., Strain specificity and production of antibiotic substances. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A., **29,** 74—79, 1943.

WAKSMAN S. A., SCHATZ A. and REYNOLDS D. M., Production of antibiotic substances by Actinomycetes. Am. New York Acad. Sci., **48,** 73—85, 1946.

WAKSMAN S. A. and WOODRUFF H. B., **Actinomyces antibioticus** a new soil organism antagonistic to pathogenic and non pathogenic bacteria. J. Bacter. **42,** 231—249, 1941.

WAKSMAN S. A. and WOODRUFF H. B., Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. J. Bact., **44,** (3), 373—384, 1942.

WALDIN G. G., The „phenol and camphor" treatment of ringworm of the glabrous skin. An interim report. J. R. Army med. Cps., **81,** (1), 32—34, 1943.

WALLACE G. I., DAY J. K. and MOORMAN H. E., Chlorophyll ointment in treatment of dermatophytosis of feet and similar lesions. Arch. Derm. Syph., Chicago, **49,** (2), 128—131, 1944.

WATKINS A. G., Two cases of pulmonary actinomycosis. Arch. Dis. Childh., **19,** (99), 143—144, 1944. **(Actinomyces bovis).**

WATRIN J. and SURDEY, Blastomycose cutanée à fyers multiples. Sem. Hop. Paris, 22, 280—283, 1946.

WATTS G. W. T., Theatment and control of epidermophytosis and bromidrosis in a State school with cadmium chloride-aerosol solution. J. Lab. clin. med., **29**, (7), 692—694, 1944.

WEIDMAN F. D., EMMONS C. W., HOPKINS J. G. and LEWIS G. M., The war and Dermatophytosis with special reference to treatment and fungicide testing. J. Am. Med. Ass., **128**, 805—811, 1945.

WEIDMAN F. D. and ROSENTHAL L. H., Chroomoblastomycosis: a new and important blastomycosis in North America., Arch. Derm. Syph., **43**, (1), 62—84, 5 figs., 1941.

WEIRICH C. and POROKNY R., Athlete's foot control. Soap, **18**, (3), 97, 99, 117, 1942.

WELSE E. C., Prevalence of sporotrichosis in Connecticut; review of three cases and report of new case. Conn. St. med. J., **6**, 841, 1942.

WEISS C., Laboratory aids in the diagnosis of infections of the eye prevalent in tropical and subtropical countries. Amer. J. clin. Pathol., **14**, (4), 200—214, 1944.

WELSCH M., Producion d'actinomycine ou d'une substance voisine par un **Streptomyces** distinct de **S. antibioticus** Waksman et Woodruf. Bull. Soc. chim. Biol., Fr., **28**, 557—566, 1946.

WESTERDIJK J., On the cultivation of fungi in pure culture. Antonie Van Leeuwenhoek **12**, 223—232, 1947. Jubilee volume Albert J. Kluyver.

WHIFFEN ALMA J., BOHONOS N. and EMERSON R. L., The production of an antifungal antibiotic by **Streptomyces griseus.** J. of Bacter., **52**, (5), 610, 1946.

WHITE E. C. and HILL J. H., Studies on antibacterial products formed by mold. I. Aspergillic acid, a product of strain of **Aspergillus flavus.** J. Bacter., **45**, 433—443, 1943.

WICKERHAM L. J., FLICKINGER M. H. and KERMIT A. B., A modification of Henrici's vegetable-juice sporulation medium for Yeasts. J. of Bacter., **52**, (5), 611, 1946.

WIKLER A., WILLIAMS E. G., DOUGLASS E. D. and EMMONS C. W., with histologic report by DUNN R. C., Mycotic endocarditis: report of a case. J. Amer. med. Ass., **119**, (4), 333—336, 1942.

WILHELM S., Isolation of **Coccidioides immitis** from sputum. Bull. of the U.S. Army Med. Dep., Wash., D. C., **5**, 468, 1946.

WILKINS W. H., Investigation into the production of bacteriostatic substance in Fungi. Preliminary examination of the fifth 100 species, all Basidiomycetes, mostly of the wood-destroying type. Brit. J. exper. Path., **27**, 140—142, 1946.

WILLIAMS J. W. and SOUTHWORTH W. H., Effect of cations on growth of certain pathogenic fungi. J. Bac., **43**, (1), 16—17, 1942.

WILLIAMSON R. E. and DeKAY H. G., A study of athlete's foot and its control, II. Amer. J. pharm. Ass., **31**, (9), 284—286, 1942.

WILSON J. E., Treatment of ringworm of the scalp. Med. Officer, **69**, (25), 197, 1943. **(Microsporum audouini).**

WINN W. A. The treatment of pulmonary cavitation due to coccidioidal infection. Calif. West. Med., Tuberc. Suppl., **57**, 45, 1942.

WISE E. G., Prevalence of sporotrichosis in Connecticut. Review of three cases and report of a new case. Conn. St. med. J., **6**, 841, 1942.

WOLF F. T., The action of sulfonamides on certain fungi pathogenic of man. Mycologia, U.S.A., **38**, 213—219, 1946. **(Monosporium apiospermum, Trichophyton, Epidermophyton, Microsporium, Sporotrichum).**

WOODRUFF H. B. and FOSTER J. W., In vitro inhibition of mycobacteria by streptothricin. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **57**, 88—89, 1944.

WOODRUFF H. B. and FOSTER J. W., Microbial aspects of penicillin. VII. Bacterial penicillinase. J. Bact., **49**, 7—17, 1945.

WYLIE P. E. W. and DEBLASE J. A., Bronchopulmonary moniliasis. J Amer. med. Ass., **125**, (7), 463—465, 1944. **(Monilia albicans).**

YAMAGUTI S., **Aspergillus fumigatus** Fresenius aus einem japanischen Sturmtaucher. Z. Parasitenk., **11**, (5), 702—703, 1940.

YANEZ D. et RAMIREZ G., Dos cases de tina del cuoero cabellude en adulto. Rev. argent. Dermatosif., **26**, (4), 1198—1190, 1942.

YATES A. L., Fungus infection of the mounth and throat and nose and ear. Canad. med. Ass. J., **50**, (6), 541—543, 1944. **(Monilia albicans, Torula, Aspergillus, Microsporon furfur).**

ZAKON S. J. and BENEDEK T., David Gruby and the centenary of medical mycology, 1841—1941. Bull. Hist. Med., **16**, (2), 155—168, 1944.

ZARAFONETIS C. J. D. and LINDBERG R. B., Histoplasmosis of Darling. Observations on the antigenic properties of the causative agent. A preliminary report. Univ. Hosp. Bull. Ann. Arbor, **7**, 47, 1941.

ZIRONI A., CARLINFANTI E., Il complesso biostatico. Medicina e Biologia, **2**, 153—180, 1943.

ZISKIN D. E., SHOHAMJ and HANFORD J. M., Actinomycosis. A report of 26 cases. Amer. J. Orthodont. oral Surg., **29**, (4), 193—201, 1943. **(Actinomyces bovis).**

Estudios sobre el Coccidioides immitis (Stiles)

I. Micelio vegetativo y de fructificación

por el Dr. P. NEGRONI.

(Instituto Bacteriológico „Malbran", Buenos Aires).

(8.6.1948)

El *Coccidioides immitis* es un hongo patógeno para el hombre y los animales descubierto por A. POSADAS de Buenos Aires en 1892, aún cuando su posición en la sistemática botánica no está definitivamente resuelta, muchos micólogos lo vinculan a los *Chytridiales* de la clase *Phycomycetes* (NEGRONI, 1946 y 1947).

Todos los investigadores han estudiado con particular interes el aspecto micromorfológico de este parásito en las lesiones donde adquiere los caracteres de una fructificación asexuada, de un esporangio, lo cual ha permitido su ubicación sistemática. La existencia de probables fenómenos sexuales ha sido señalada por CIFERRI y REDAELLI en 1936 (3) y por NEGRONI (2).

Los caracteres microscópicos de los cultivos han cautivado, por el contrario poco la atención de los micólogos. En este trabajo nos ocuparemos de este último tópico que hemos abordado al estudiar, comparativamente, algunas cepas autoctonas y otras norteamericanas.

Al observar el desarrollo del *C. immitis* en los medios artificiales de cultivo podemos apreciar la formación de un micelio aéreo, de un micelio superficial o rampante y de un micelio sumergido o profundo. El estudio microscópico del material tomado de estas formaciones nos permite diferenciar el micelio vegetativo que forma la masa de la colonia y es tanto aéreo como superficial y sumergido y un micelio de fructificación aéreo.

Micelio vegetativo

Estudiaremos sucesivamente el micelio vegetativo común y formaciones especiales: clamidosporos, micelio en raqueta, órganos nodulares, apresarios y otras formaciones.

El micelio vegetativo común está constituido por una trama de filamentos ramificados con algunos caracteres particulares. Sus hifas son bastantes rectas, poco flexuosas y con pocos tabiques. La formación de tabiques en el micelio vegetativo es poco común en los *Phycomycetes*, pero se los ha observado en especies de *Catenaria* y *Endogone* y, justamente, su micelio poco tabicado afianzaría su posición entre los *Chytridiales*.

El micelo vegetativo no tiene un diámetro uniforme, sino, por el contrario sumamente variable. Es muy plástico. Al lado de filamentos de unas 5 μ de diámetro se observan otros de 1,40 μ, originandose, a veces, estos últimos como ramas del primero, según lo ilustra la fig. 1. Otras veces un mismo filamento cambia bruscamente de diámetro en varios puntos de su trayecto, como si se observara una cinta de frente y de canto.

En los medios de cultivo adicionados de 1 % de diferentes grasas (animal o vegetal), el micelio se presenta aparentemente rugoso debido al depósito de finas gotitas de grasa.

Clamidosporos: verdaderos quistes de un diámetro bastante mayor que

el del filamento que los originan. Son generalmente aislados, intercalares o terminales y su diámetro medio oscila de 8 a 8,5 μ (fig. 1).

Micelio en raqueta: mide en la parte dilatada unas 6 μ de diámetro y 3,50 μ de diámetro el filamento que origina la raqueta.

Organos nodulares: fueros descriptos por NEGRONI y VILLAFAÑE LASTRA en la cepa N° 1751 clasificada como *Trichosporon proteolyticum* desarrollada en el medio de Czapeck, pero donde todas las cepas lo forman con el máximo de desarrollo es en el medio sintético siguiente: Cloruro de amonio 1 %; acetato de sodio 1 %; fosfato tribásico de potasio 0,8 %; agar 2 % y 1 % de grasa animal (de cerdo, manteca), vegetal (aceite de olivas) o ácido oleico.

El examen microscópico del micelio desarrollado al cabo de pocos dias de incubación a 25° C revela la formación de „primordiums" de pocas micra (2—3) de diámetro a expensas de filamentos de 1,5 μ que, frecuentemente, concurren de dos o más puntos distantes (sinfiógenos). No hemos podido reconocer en estos ovillos o pelotones iniciales la diferenciación de hifa sexual alguna. El „primordium" aumenta de volúmen por sucevas ramificaciones de los filamentos, sin que estos modifiquen, apreciablemente, su diámetro y por la fusión con „primordium" vecinos hasta llegar a medir 1 a 2 mm. de diámetro. En este momento está formado por un plecténquima (peosénquima) en el cual los filamentos conservan aún su individualidad, sin que sea posible reconocer la formación de una corteza pseudoparen quimatosa y de una zona medular. Serían formaciones intermedias entre el bulbillo y el esclerote, mayores que el primero y sin los caracteres morfológicos del segundo.

Nosotros hemos seguido la evolución de estos esclerotes imperfectos durante algo más de tres meses, presentándose siempre macizos. No se forman en su interior cavidades ni esporos. Cuando envejecen adquieren un tinte ligeramente pardusco.

Lá formación de estos elementos parece especialmente estimulada por la presencia de grasas pues a menudo se los ve originarse en un globulo de grasa y, respecto a su significado, creemos que representan, probablemente, elementos de reserva.

Apresorios: fueron también señalados por NEGRONI y VILLAFAÑE LASTRA (4).

Se trata de un micelio fino de 1,50 μ, aproximadamente, ramificado, como raicillas o formando una especie de escobilla (fig. 1).

Otras formaciones vegetativas: Micelio perforante o penetrante („Durchwachsung" en alemán) lo hemos observado en algunos cultivos en medios con 1 % de grasa asi como la formación de anastomosis lateral entre hifas vegetativas y, también la de funículos.

Micelio de fructificación. La mayoría de los autores americanos han descripto en este hongo la formación de elementos designados, frecuentemente, como clamidosporos y otras como astrosporos. Fué EMMONS, C. W. (5) el primero en llamar la atención sobre su formación en ramas especiales del micelio aereo.

Los mismos elementos habian sido descriptos por NEGRONI y VILLAFAÑE LASTRA en 1938 (4) en la cepa 1751 clasificada como *Trichosporon proteolyticum* y bautizados como *clamidoartrosporos* por poseer, aparentemente, caracteres de ambas formaciones.

El examen microscópico de los cultivos nos permite diferenciar tres tipos de clamidosporos: 1) clamidosporos comunes intercalares o terminales, de mayor diámetro que el filamento vegetativo, que ya hemos descripto. 2)

clamidoartrosporo del micelio sumergido o superficial y 3) clamidoartrosporos aereos. Es sobre estos últimos que nos vamos a detener por considerarlos como una verdadera fructificación del micelio aereo.

En los medios sólidos de cultivo particularmente en los medios minerales (Stanford o Czapek) ciertas cepas (N° 695 y B) forman un micelio aereo algodonoso o aracnoideo muy fino y mas desarrollado en la zona periférica de la colonia. El examen microscópico de cultivos de 4 a 5 dias permite apreciar que de la trama aerea del micelio vegetativo fino se desprenden filamentos granulosos, sin vacuolas, con pocas granulaciones grasas y de un diámetro medio de 3,50 m.

Un tabique basal separa la hifa terminal rica en protoplasma homogéneo indice de su intensa actividad metábolica, del resto del micelio vegetativo. Este filamento fértil o *proconidia* se tabica en sentido basípeto, originando artículos isodiámetricos. El mismo proceso de tabicamiento en sentido basipeto tiene lugar en los filamentos fértiles ramificados, sin que hayamos podido notar que el tabicamiento del eje principal preceda al de las ramas, pareciendo ocurrir lo contrario, por lo menos en las ramas proximales.

Todo pareceria indicar que se tratara de un simple fenómeno de artrosporulación; sin embargo la evolución posterior de estas hifas fértiles conduce a la formación de elementos particulares. En efecto, con bastante regularidad comenzanda desde el vértice, es decir, en sentido basípeto a una célula fértil sucede otra estéril, abortiva, que no evoluciona y cuyo contenido celular desaparece posiblemente absorvido por las células fértiles vecinas. Repetimos que *la primeria célula fértil es la apical*, de extremo redondeado y de base cortada a pico. Su diámetro es mayor que el de la última célula fértil, basal, alargada y rectangular.

Las células fértiles quedan asi delimitadas por dos tabiques formados „de vo" que se fusionan solidamente a la pared de la hifa fértil. En las preparaciones montadas en el líquido de Guéguen (con azul cotton) se puede apreciar que las „proconidias" se tiñen intensamente de azul y que de este colorante se deposita más intensamente en los puntos de origen de los tabiques transversales, indicando su formación por un espesamiento anular de la membrana que progresa hacia el centro. Un poco más tarde, cuando se establece la diferenciación biológica entre célula fértil y abortiva, el colorante se deposita más intensamente, también, en todo el contorno de la primera, lo cual nos induce a pensar que, tal vez, se forme una membrana propia en el esporo. En la oportunidad hemos sorprendido una formación protoplasmática desprendida en bloque del pédiculo del filamento fértil (fig.) lo cual confirmaría los dos fenómenos morfológicos descriptos, de particular interés: 1) la formación de una „proconidia" y su tabicamiento posterior dilimitando los esporos y 2) la formación de una membrana propia en todo el contorno de los mismos. Si realmente este fenómeno tiene lugar, la membrana del esporo se fusiona muy solidamente con la del filamento fértil, a tal punto que, en los cultivos adultos, se observan numerosos esporos libres por ruptura de la membrana del filamento fértil en los puntos correspondientes a las células abortivas. Es esporo tiene, en este momento, una forma rectangular con sus bordes ligeramente salientes, con el aspecto de toneletes, de $4 \times 3{,}50\ \mu$.

Significado de la fructificación del Coccidioides immitis.

Los esporos que el *C. immitis* forma en las hifas del micelio aereo, no son artrosporos questo que estos se liberan por „clivaje" de los tabiques trans-

versales, tampoco son „conidia vera" dado que, en el concepto de VUILLEMIN, estos esporos se separan enseguida del vértice de un conidióforo generalmente afilado. MASON, E. W. (6) ha profundizado estos estudios morfológicos y, en su concepto, las conidias típicas se forman, generalmente, por sucesión basípeta en el vértice de un canidióforo afilado (fialide) que es un punto abierto en crecimiento (esporos fialomeristémicos).

Los esporos del *C. imitis* son, pues, thallosporos, puesto que forman parte de la hifa que los lleva y, dado su mecanismo de formación, corresponden a los „Entosporados" de VUILLEMIN (7). La liberación de estos entosporos tiene lugar por la ruptura de la membrana del filamento fértil a nivel de la célula abortiva que funciona, entonces, como un verdadero separador (*disjoncteur* en francés, *Disjunktor* en alemán) (8).

Estos entosporos parecen formarse también en las hifas del micelio rampante o sumergido, pero en número reducido e irregularmente. Aun en el micelio aereo fértil el proceso no se cumple invariablemente con la regularidad que hemos descripto, pues se ven en ocasiones dos entosporos adheridos o la formación de un tabique que divide una célula abortiva, pero estas anomalias, digamos, no quitan valor a nuestro juicio, al mecanismo de entosporulación.

Finalmente diremos que estos entosporos recuerdan a los formados por el género *Malbranchea* (SACCARDO) (9-10-11) y, que según su mecanismo de diseminación, corresponden al grupo de los esporos secos (dry-spores) de MASON. Los restos de la célula vacía (separador) que coronan ambos polos del esporo facilita su diseminación y permanencia en el aire (esporos anemófilos).

Germinación de los entosporos: En cámara humeda y en el medio líquido de Stanford, mencionado más arriba, los esporos germinan al cabo de cinco dias de incubación a 37° C. Su diámetro aumenta hasta 5,85 y emite, sucesivamente, hasta tubos germinativos.

Si sembramos en medio sólido de Stanford en caja de Petri dividida en 8 sectores, mediante una serie correspondiente de estrías y cortamos un bloque de agar cada 24 horas para examinarlo, depositando en la parte fértil un cubre objeto y montando en el líquido de Guéguen, podemos apreciar que la germinación de esporos tiene lugar a las 24 horas. En repetidas oportunidades hemos notado la separación, en el momento de germinar, de la membrana propia del entosporo de la del filamento fértil. La emisión de tubos germinativos se opera tanto lateralmente como por sus extremos.

Resumen

El *Coccidioides immitis* forma, en los medios sólidos de cultivos, un micelio vegetativo y otro de fructificación. El primero es aereo, superficial o rampante y sumergido o profundo. El micelio de fructificación se forma como ramas fértiles del micelio aereo.

El micelio vegetativo es poco tabicado y de un diámetro muy irregular oscilando de 1,40 μ a 5 μ se presenta en ocasiones acintado. Ofrece las siguientes formaciones especiales: clamidosporos intercalares o terminales de un diámetro medio de 8 μ, micelio en raqueta, apresorios, funiculos, anastomosis vegetativas y esclerotes rudimentarios de 1 a 2 mm. de diámetro.

El micelio de fructificación comienza con la delimitación de una „proconidia" simple o ramificada que deja, en ocasiones, un pedículo de longitud variable a modo de esporóforo. La „proconidia" se tabica en sentido basipeto origunando una serie de células rectangulares que se diferencian en célula

fértil y otra estéril o abortiva. La célula apical es siempre fértil. La célula fértil es un entosporo que mide término media 4 × 3,50 μ queda libre por la ruptura de las paredes de la hifa a nivel de las células abortivas que funcionan como separadores.

Resumé

Le Coccidioides immitis forme dans les cultures en milieux solides un mycélium végétatif et un mycélium de fructification ou reproducteur. On peut differentier dans le premier; a) un mycélium aérien, b) un mycélium superficiel ou rampant et c) un mycélium immergé ou profond. Le mycélium de fructification naît du mycélium aérien.

Le mycélium végétatif est peut cloisonné et d'un diamètre très irrégulier de 1,4μ at 5 μ. Il est parfois rubané. On peut reconnaître les formations vegetatives suivantes: chlamydospores terminales ou intercalaires d'un diamètre moyen de 15 μ; mycelium en raquette; appressorium, funiculus, des anastomoses végétatives et des sclérotes rudimentaires de 1—2 mm. de diamètre. Le mycélium réproducteur consiste dans la délimitation d'une „proconidie" simple ou ramifiée de 3,5 μ de diamètre, laissant parfois un pédicule d'une longueur variable à la façon de sporophore. La „proconidie" se cloisonne en direction basipète aboutissant à la formation d'une série régulière de cellules rectangulaires dont l'une est fertile et la suivante stérile ou abortive. La cellule apicale est toujours fertile. Les cellules fertiles sont des entospores (thallospores) de 4,5 x 3,5 μ en moyenne et ils restent libres par la rupture du filament fertile au niveau des cellules abortives qui fonctionnent comme des disjoncteurs.

Summary

Coccidioides immitis develops on solid culture media a vegetative and a fertil mycelium. The first one may be aereal (superficial or prostrate) and immersed or profound. The fertile mycelium is formed as branches of aereal mycelium.

The vegetative mycelium is sparsely branched and of irregular thickness, varying from 1,40 μ to 5 μ. It is occasionally ribbon-like, and it shows the following special formations: chlamydospores (intercalary or terminal) of an average diametre of 15 μ, racket mycelium, appressoria, funicula, vegetative anastomosis and rudimentary sclerotia of 1 to 2 mm. in diametre.

Fertile mycelium begins with the demarcation of single or branched "proconidia" which occasionally bear a pedicle or sporophore-like formation. Proconidia divide then basipetally leading to be formation of a row of cells one of which is fertile and the following sterile or abortive. Apical cells are always fertile. Fertile cells are entospores (thallospores) of an average diametre of 4,5 x 3,5 μ and are liberated by the rupture of the hyphal walls at the place of empty cells which function as disjunctors.

Bibliografía

1 Negroni, P. y Radice, J. ., Rev. Arg. Dermatosif, 1946, **30**, 219. —
2 Negroni, P. y Radice, J. ., Sobre la formación Cde endosporos en Pseudococcidioides y Cocciodiodes. Eprensa. —
3 Ciferri, R. e Redaelli, P., Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. Microbiol., 1934, **4**, 2. —
4 Negroni, P. y Villafañe Lastra, T., Mycophatología, 1939—40, 2, 52. —
5 Skinner, C. E. Emmons, C. W. and Tsuchiya, H. M., Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes. John Wiley & Sons, Inc., N.York, 1947. —
6 Mason, E. W., Annotated account of fungi received at the Imperial Micological Institute. List. 11, Kew Surrey, 1933 (fasc 2). —
7 Vuillemin, P., Les Champignons parasites et les mycoses de l'homme. P. Lechevalier & Fils, París, 1931. —
8 Negroni, P., Morfología y biología de los hongos. El Ateneo, Bs. Aires, 1938. —
9 Vaccari, E., Baldacci, E. e Ciferri, R., Mycopathología, 1939—40, 2, 43. —
10 Dodge, C. W., Medical Mycology. St. Louis. The C. V. Mosby o., 1935. —
11 Redaelli, P. e Ciferri, R., Le granulomatosi fungine, etc. In tratato de Micopatología umana, vol. 5, 1942. S.E.S. Firenze. —
12 Ainsworth, G. C. and Bisby, G. R., A dictionary of the fungi. The Imp. Myc. Institute, Kew, Surrey, 1943. —

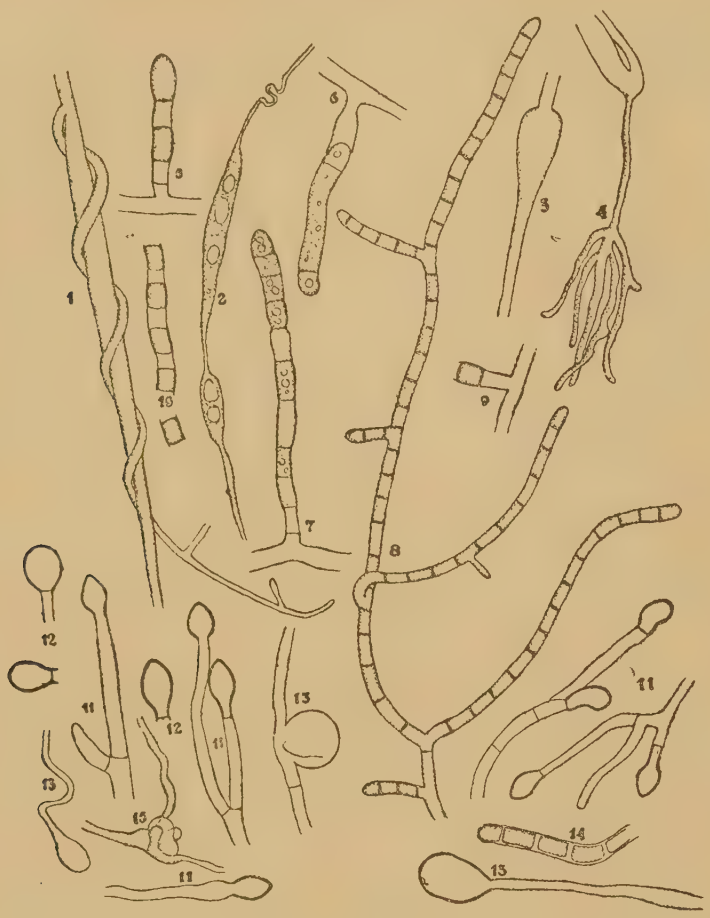


Fig. 1. Diversos aspectos del micelio vegetativo y de fructificación tomados con la cámara clara. 1 y 2: micelio vegetativo de diámetro irregular. : micelio en raqueta, 4: apresorio. 6 a 10: micelio de fructificación consistente en la formación de entosporos separados por células vacías (separadores). 11 a 15: diversos aspectos de la cepa "Ota" tipo *Scopulariopsis*.

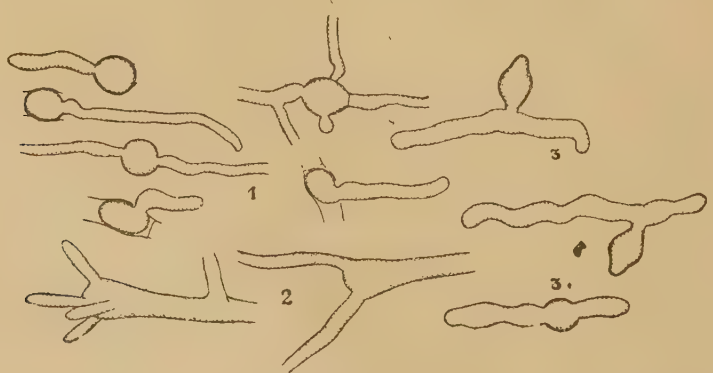
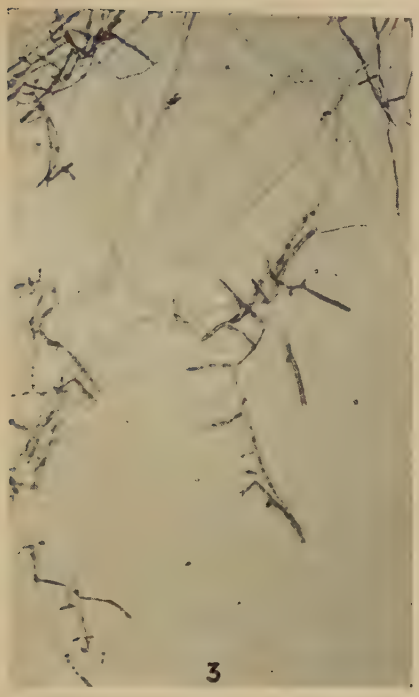
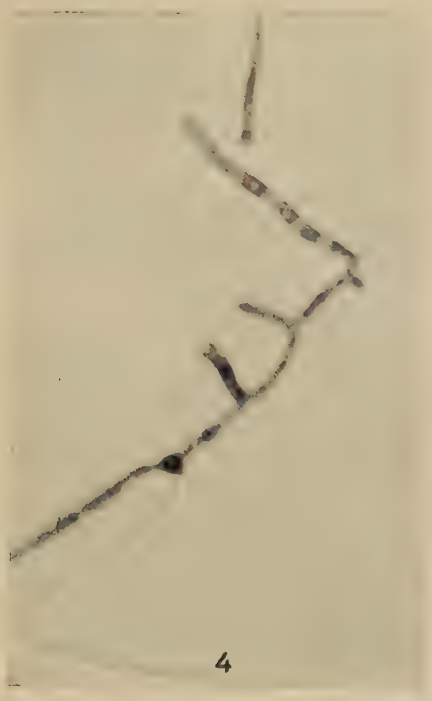
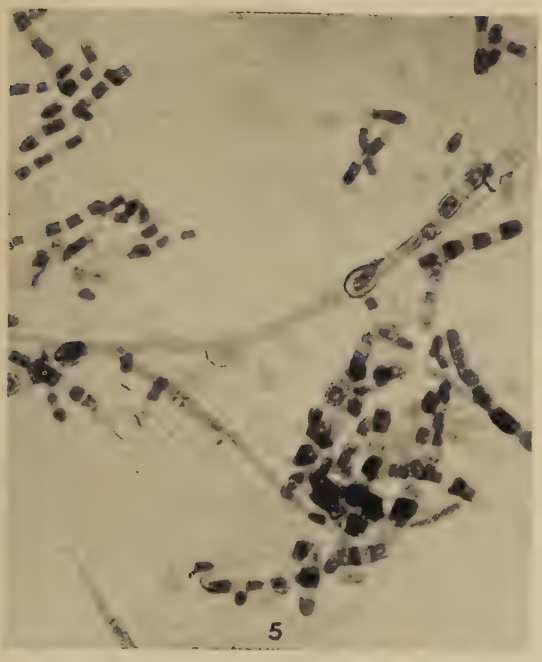


Fig. 2. Germinación de los entosporos del *C. immitis* (se aprecia la existencia de una membrana propia). 2: micelio vegetativo con di y tetratomío. 3: germinación de los esporos de la cepa „Ota" tipo *Scopulariopsis*.







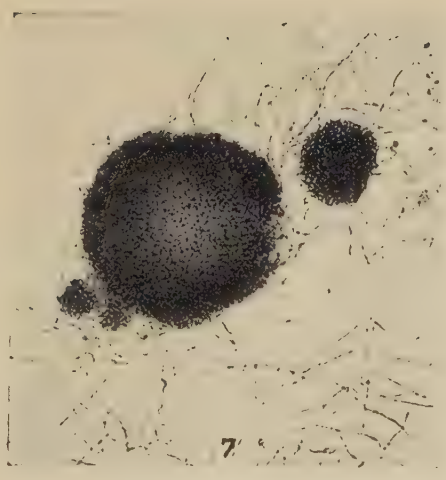


Fig. 3, Micelio de fructificación aéreo del C. inmitis visto a pequeno aumento.
Fig 4, Proconidia ramificada del C. immitis conformación de entosporos.
Fig. 5, Micelio en raqueta y entosporos maduros con separadores (células vacias) del C. immitis.
Fig. 6, Primordium sinfiógeno del C. immitis en la formación de esclerotes.
Fig. 7, Esclerotes rudimentarios que tienden a fusionarse.

Estudios sobre el Coccidioides immitis Rixford et Gilchrist.

II. Estudio micológico de las cepas autoctonas y revisión del granuloma coccidioídal en la Argentina

por P. NEGRONI.

(Instituto Bacteriológico „Malbran" y Cátedra de Clínica Dermatosifilográfica, Buenos Aires).

(8.6.1948).

El granuloma coccidioidal fué descubierto por ALEJANDRO POSADAS de Buenos Aires (1) quien lo estudió en colaboración con su maestro ROBERTO WERNICKE, de ahí que esta affección se la designe, también, como *enfermedad de Posadas-Wernicke.*

Su agente fué tan minuciosamente estudiado por POSADAS que, salvo la obtención de los cultivos, poco es lo que se ha agregado en los 50 años siguientes. Llama la atención, sin embargo, el escaso numero de observaciones que han seguido a la original, cuyos datos fundamentales resumidos en el cuadro adjunto, y que ninguna de ellas fuera acompañada del estudio micológico de los cultivos. Este hecho ha motivado que en los E.E.U.U., donde se ha profundizado el estudio de esta enfermedad, ciertos autores llegaran a dudar de la autenticidad del descubrimiento de POSADAS. Transcribimos al respecto algunos párrafos de la publicación de KESSEL, J. F. (2).

"The first case of *Coccidioides* on record is supposed to have been observed in Argentina by POSADAS and WERNICKE in 1891. However since no subsequent cases have been reported from this area one may question whether they actually were dealing with the fungus we now know as *Coccioides immitis*"; y DODGE, C. W. (3) en su tratado de „Medical Mycology" dice en la pag. 148: "Unfortunately none of the Argentine organisms has been cultivated so we can't compare cultural characters".

Por otra parte STILES, G. W. y DAVIS, C. L. (4) refieren en su estadística (14) casos registrados en la America del Sud, cifra que no hemos podido confirmar.

Nuestro trabajo viene pues a llenar, por primera vez, una sentida necesidad no solamente para la información bibliográfica de nuestro pais, sino también del exterior.

Como puede apreciarse en el cuadro, solamente hemos logrado reunir datos de 7 casos observados en la Argentina, dos de los cuales son aún inéditos (casos N° 6 y 7). Este escaso numero de observaciones no nos permite tener una idea exacta de su destribución geográfica y de la sintomatología inicial. Sin embargo, salvo los dos primeros casos en los cuales la puerta de entrada del parásito se ignora o fué aparentemente externa,

los restantes parecen haberse iniciado con un cuadro broncopulmonar agudo semejante a la gripe, seguido más tarde de diseminación metastásica como en las observaciones norteamericanas (5, 6, 7 y 8).

En los casos observados se trata de sujetos adultos, entre 20 y 50 años en contacto con el medio rural y contaminados, al parecer, en 3 zonas muy apartadas de nuestro continente, a saber el Chaco, provincia de Córdoba y Pampa Central.

Estudio Micológico.

El estudio que exponemos a continuación se refiere a los tres cultivos (cepás N° 1751, 695 y 696, 5 de la micoteca del Instituto Bacteriológico „Malbran") obtenidos por primera vez en el pais.

En agar sangre de conejo al 5% sembrado en caja de Petri e incubado a 30° C la colonia llega a medir, aproximadamente, unos 4,5 cm. de diámetro al cabo de 8 dias. Es ligeramente saliente, lanosa y de un color blanco sucio con un tinte verdoso en ocasiones. Zonada o hemizonada (circulos concéntricos con diferente cantidad de micelio aereo).

En agar caldo glucosado al 1%: el mismo aspecto de la colonia.

En el medio de Stanford (8): las cepas No 695 y 696.5 desarrollaron formando un micelio aereo fino, lanuginoso, en tanto que la cepa No 1751 formó una colonia plana, lampiña, casi desprovista de micelio aereo y con algunas mechas en el centro (funículos).

El estudio de nuestras tres cepas y de 7 norteamericanas, nos ha permitido comprobar que todas presentan, salvo pequeñas diferencias en relación con el medio de cultivo y la temperatura de incubación, el mismo aspecto.

Forman colonias lanosas o algodonosas en toda su superficie o en el centro, zonadas o hemizonadas, es decir presentando, su micelio, círculos concéntricos. En los medios con 1% de grasa la colonia adquiere un tinte pardusco, particularmente por el reverso.

Tenemos la impresión que la cepa 1751 ha perdido, en gran parte, la propiedad de formar micelio aereo, desarrollando, en cambio, funículos debido al tiempo transcurrido desde que se la cultiva en los medios artificiales.

En *caldo glucosado* forman una película gruesa, humeda y lampiña, sin micelio aereo y uno o varios copos algodonosos en el fondo.

En el *medio líquido de Stanford* (8) tienden, en cambio, a formar un micelio aereo escaso.

Caracteres microscópicos: el micelio vegetativo es poco tabicado y de un diámetro muy desigual variando de 1,40 μ hasta 5 μ observándose que, en ocasiones, las ramas finas parten de un filamento grueso y se arrollan a su alrededor o forman lazos (fig. 1). Otras veces el micelio varía bruscamente de diámetro como si fuera una cinta que se presentara de frente y de canto.

El micelio vegetativo presenta los siguientes elementos particulares: clamidosporos de 5 a 29 μ de diámetro intercalares o terminales, micelio en raqueta que mide unas 6 μ en la parte dilatada, apresorios, funículos, anastomosis vegetativas latero-lateral o termino-lateral y, en los medios con grasa, esclerotes rudimentarios que llegan a medir 1 a 2 mm. de diámetro.

El micelio fructificación nace del micelio aereo y, en su forma característica, comienza con la delimitación de una „proconidia" simple o ramificada, dejando un pedículo de longitud variable tabicado o no, a modo de esporóforo. La „proconidia" se tabica en sentido basípeto y, si es ramificada, el tabicamiento tiene lugar simultáneamente en el eje principal y en las ramas. Los artículos son rectangulares y se diferencian desde el vértice hacia la base de una sucesión de células de la cual una es fértil y la siguiente abortiva o estéril. La célula fértil tiene los caracteres de un entosporo (thallosporo) y se libera por la ruptura de las paredes de la célula abortiva que

funciona como separador. Los entosporos tienen dimensiones que oscilan entre 2,60 x 2,35 μ hasta 7,20 x 3,50 μ siendo, comunmente de 4,50 x 3,50 μ.

Las cepas 695 y 696,5 son, practicamente, idénticas. La cepa 1751 tiene, por el contrario, una escasa capacidad de esporulación en relación con su menor tendencia a formar micelio aereo en casi todos los medios de cultivo. La propiedad de esporular está en íntima relación con la composición del medio, siendo los medios salinos: el de Czapeck y el de Stanford los más favorables y el agar glucosado y agar miel de Saboraud los menos apropiados, particularmente el último medio de cultivo.

Creemos que estas modificaciones macro micromorfológicas, a saber, la reducción de la capacidad de formar micelio aereo y estosporos estan en relación con procesos degenerativos que sufre el hongo por los continuos transplantes en los medios artificiales de cultivo, particularmente en los medios nitrogenados complejos y azucarados.

Propiedades fisiológicas.

Para efectuar este estudio sembramos las cepas en el medio utilizado en el „Bureau of Animal Industry" para la obtención de la tuberculma modificado: Asparagina 7 g., cloruro de amonio 7 g., fosfato bipotásico 1,30 g., citrato de sodio 0,50 g., sulfato de magnesio 1,50 g., citrato de hierro 0,30 g., cerelosa 10 g., glicerina 25 g., agua destilada 1.000 ml. y, cuando se obtuvo el desarrollo de una buena película, al cabo de 20 dias a 1 mes de incubación a 28° C., se la molió cuidadosamente en un mortero estéril con arena fina. Este material fué lavado 3 veces por centrifugación con solución fisiológica para eliminar los restos del medio de cultivo y el sedimento fué utilizado para el estudio de su fisiología.

Acción sobre las fuentes de C.: Carece de la propiedad de desprender gases, pero utiliza, para su vegetación, ciertas fuentes de C de preferencia a otras. Empleamos en estas experiencias el medio de BAKER y SMITH (12) con 0,2% de cloruro de amonio y 1 de las siguientes fuentes de carbono: glucosa, levulosa, manosa, galactosa, ramnosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealoso, rafinosa, inulina, dextrina, almidón, arabitol, manitol, glicerol, sorbitol, acetato de sodio, citrato de sodio, oxalato de sodio, y tartrato de sodio, disponiéndolas en dos series por duplicado. En la primera serie de experiencias el medio fué repartido en tubos inclinados en pico de clarinete y luego sembrados depositando en el centro de cada uno de ellos un asa del material finamente molido. En la segunda serie, el medio sin fuente de carbono, fundido y a 48° C., fué densamente sembrado con la cepa en estudio y vertido en caja de Petri. Una vez el medio solidificado y puesto a secar en la estufa, se dividió el fondo de la caja de Petri en 4 sectores y se depositó en la superficie del medio, la fuente de C en substancia, vale decir, utilizamos el método auxanográfico de Beijerink.

Lectura de los resultados: anotamos la intensidad del desarrollo cada 4 dias durante 16 dias de incubación a 28° C, midiendo el diámetro de la colonia en la primera serie y la densidad del desarrollo en el método auxanográfico. Los resultados han sido similares.

Todas las cepas estudiadas utilizan mejor los monosacáridos que las pentodas, los di y polisacáridos y los alcoholes. El sorbitol ha sido, en general, mejor utilizado que el arabitol, glicerol y manitol. El acetato de sodio es una fuente de carbonato tan preferida por las cepas de *C. immitis* estudiadas como los monosacáridos, en cambio el citrato, oxalato y tartrato de sodio son poco o nada utilizados.

Utilización del alcohol etílico: sembramos el material en el medio líquido mineral con 3% de alcohol etílico empleado por STELLING-DEKKER (13) en el estudio de las levaduras. El *C. immitis* utiliza el alcohol etilico como fuente de carbonio.

Acción sobre la celulosa empleamos la técnica de BAKER y SMITH (12) comprobando que este hongo se desarrolla muy pobremente o nada cuando la celulosa es la única fuente de C.

Acción sobre las grasas: utilizamos en este estudio el medio de BAKER y SMITH (12) adicionado al 1% de manteca, grasa de cerdo, aceite de olivas y ácido oleico cuando el medio estaba fundido y a 50° C. Agitamos insistente mente para emulsionar y lo vertimos en cajas de Petri que fueron inmediatamente colocadas en la cámara fria. Cada caja con estas diferentes fuentes de carbono, fué dividida en 4 sectores, en cada de los cuales se sembró una sepa de *Coccidioides immitis.* Todas se desarrollaban aproximadamente con la misma intensidad en las cajas de Petri y, el examen microscó-

pico del material recogido a nivel de las colonias, nos ha revelado el ataque de las grasas mencionadas, sea por la formación de cristales de ácidos grasos o por la corrosión de los glóbulos de grasa por el desarrollo miceliano.

Las grasas provocan, además, la formación de esclerotes rudimentarios que señalamos por primera vez en otra publicación.

Hemos estudiado, también la, acción sobre extratos de *Mycobacterium phlei* en la forma siguiente: Pesamos 4 lotes, de 250 mg. cada uno, de pelicula desecada y finamente molida y le adicionamos 5 ml. de los siguientes solventes orgánicos: acetona, cloroformo, alcohol 95% y eter, sometiendo los tres primeros a una breve ebullición y dejándolos, todos, durante 24hs en la heladera. Preparamos tubos con 20 ml. de medio de Baker y Smith fundido y a 50° C. y adicionamos 3 ml. de cada uno de los extratos mencionados, agitamos para emulsionar y enfriamos en la cámara fria sembrando, luego, como en la expericencias anteriores.

Todas las cepas se desarrollaron bien en los 4 extratos, notándose al cabo de 1 semana la incubación a 2′° C. un amplio halo claro alrededor de las colonias desarrolladas en los extratos alcohólicos y acetónico.

Acción sobre las fuentes de nitrógeno: Estas experiencias fueron conducidas en forma análoga a las efectuadas en el estudio de la acción sobre las fuentes de carbonio, comprobando que la peptona, asparagina, sulfato de amonio urea y cloruro de amonio son buenas fuentes nitrogenadas para asegurar un amplio desarrollo del hongo en estudio que es más exuberante en el medio peptonado, posiblemente porque la peptona es, además, una buena fuente de C. Se desarrolla menos intensamente en los medios con histidina y nitrato de potasio.

Acción proteolítica: Ninguna de las cepas se desarrolló en el mosto de cerveza gelatinado. Se desarrollaron bien, en cambio, en el suero de caballo coagulado dirigiéndolo más o menos intensamente según las cepas.

La leche es peptonizada en pocos dias.

Reducción de nitratos en nitritos, formación de indol y de SH_2 de fuente orgánica (suero de caballo coagulado): negativas.

Producción de hemolisina para la sangre de conejo: Sembramos las cepas en agar sangre al 5% en cajas de Petri por duplicado incubando a 28° y a 37° C. Las cepas 695 y 696,5 no produjeros hemolisinas y esta acción fué, en cambio, positiva en la cepa 1751.

Temperatura óptima del desarrollo: en la vecindad de los 30° C.

Hasta el presente se han señalado 7 casos de coccidioidomicosis en la Argentina, dos de los cuales son aun inéditos. El estudio micológico de tres cepas obtenidas de los casos 4, 6 y 7 nos ha revelado que sus caracteres coinciden con los de las cepas norteamericanas. Las colonias son vellosas o lanosas, blancas, zonadas o hemizonadas.

El micelio vegetativo forma clamidosporos, micelio en raqueta, apresorios funiculos, anastomosis y, en los medios con 1 % de grasa, esclerotes rudimentarios. El micelio de fructificación nace del micelio aereo y consiste en la formación de entosporos intercalados entre células vacias que funcionan como separadores.

Utilizan mejor los monosacáridos y el acetato de sodio que otras fuentes de carbono. El cloruro de amonio es la fuente nitrogenada mas simple mejor utilizada. Son proteoliticas y algunas cepas hemolizan la sangre de conejo.

Resumé

On a rapporté jusqu'à present 7 cas de coccidioidomycose dans l'Argentine, dont deux sont encore inédits. L'étude mycologique de 3 souches nous a révélé qu'elles sont identiques aux souches nord-americaines. Les colonies sont véloutées ou laineuses, blanches, zonées ou hémizonées.

Le mycélium végétatif forme des chlamydospores, mycélium en raquette, appressorium, funiculus, des anastomoses vegetatives et, dans les milieux avec 1% de graisse,

des sclérotes rudimentaires. Le mycélium de fructification naît du mycélium aérien et consiste dans la formation d'entospores (thallospores) separés par des cellules vides qui fonctionnent comme des disjoncteurs.

Elles utilisent mieux les monosaccharides et l'acétate de sodium que les autres sources de carbone. Le $ClNH_4$ est la source d azote plus simple qui fournit un bon developpement du *C. immitis*. Les souches étudiées sont protéolytiques et quelques unes hemolisent le sang du lapin.

Summary

Seven cases of coccidioidomycosis have been reported until now in Argentina, 2 of which are not yet published. Mycological characters of the 3 Argentine strains are identical with those of the North-American strains. Colonies are velvety or floccose, white, zonate or hemizonate. Vegetative mycelium forms: chlamydospores (intercalary or terminal), racket mycelium, appressoria, funicula, vegetative anastomosis and rudimentary sclerotia.

Fertile mycelium develops as branches of the aereal mycelium and leads to the formation of entospores (thallospores) separated by empty cells which function as disjunctors. They utilize monosaccharides and sodium acetate better than other carbon sources. Ammonium chloride is the simplest nitrogen source which provides a good growth of *C. immitis*. Argentine strains are proteolytic and one of them hemolize rabbit's red blood corpuscles.

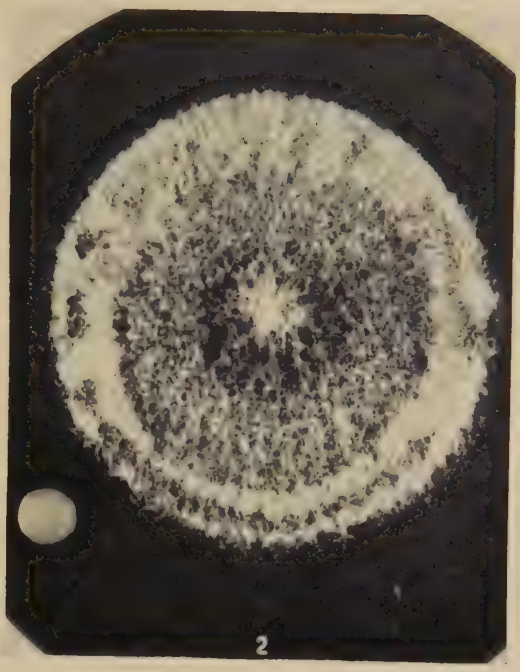
Agradecemos muy sinceramente a los Drs. IGNACIO BASOMBRID y JULIAN PRADO los datos gentilmente suministrados de los casos N° 6 y 7.

Bibliografía

1 Posadas, A., Obras completas. Imprenta de la Universidad. Buenos Aires, 1928, p. 132. —
2 Kessel, J. F., Am. J. Trop. Med., 1941, **21**, 447. —
3 Dodge, C. W., Medical Mycology. C. V. Mosby Co. St. Louis, 1935. —
4 Stiles, G. W. and Davis, C. L. J.A.MA., 1942, **119**, 765. —
5 Gifford, M. A., Ann. Rept. Kern ounty Dept Pub. Health, 1938—1939, 73. —
6 Dickson, E. C., J.A.M.A., 1938, **111**, 1362. —
7 Smith, E. C. and Baker, E. E., Weekly Bull. Cal. State Dept. Pub. Health, 1941, **20**, 113 y 117. —
8 Smith, E. C., The Clinics of N. America, 1943, **27**, 790. —
9 Skinner, C. E., Emmons, C. W., and Tsuchiya, H. M. Henrici's Molds, Yeasta and Actinomycetes. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1947. —
10 Jacobson, H. P., Fungous diseases. Ch. Thomas. Baltimore, Maryland, 1932. —
11 Stewart, R. A. and Meer, K. F., J. Inf. Dis., 1938, **63**, 196.
12 Baker, E. E. and Smith, C. E., J. Inf. Dis., 1942, **70**, 51. —
13 Stelling-Dekker, N. M. Die Sporogenen Hefen. Uitgave van de Koninklijke Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, 1931. —
14 Negroni, P., Morfologia y biologiá de los hongos. El Ateneo, Buenos Aires, 1938. —
15 Mazza, S. y Parodi, S., Bol. Inst. Clin. Quir., Bs. As., 1927, **2**, 909. —
16 Schena, A. T. y Mosto, D., La Semana Méd., 1935 (2), 1623. —
17 Negroni, P. y Killafañe, L., Mycopathologia, 1939—1940, **2**, 52. —
18 Jorge, J. M., Niño, F. L. y Latienda, R., La Prensa Méd. Arg., 1946, **36**, 630. —
19 Prado, J., Insausti y Matera. Comunicación verbal. —
20 Basombrio, I. y colaboradores, Comunicación verbal. —
21 Negroni, P. y Radice, J. C., Rev. Arg. Dermatosif., 1946, **30**, 219. —

Caso No	Autores	Procedencia	Edad Sexo	Lesiones iniciales y localización	Cultivos	Observaciones
1	Posadas, A. 1892 (1)	Pampa central	36a M.	Pómulo derecho	?	Diseminación cutánea por autoinoculación?
2	Mazza y Parodi 1928 (15)	Chaco Arg.	? M.	Tumor prelaringeo	No se obtuvieron	
3	Schenna y Mosto 1936 (16)	?	33 M.	Pulmonares con diseminación metastacia	No se obtuvieron	
4	Negroni y Villafane L. 1938 (17)	Serrezuela (Córdoba)	41a M.	Bronco-pulmonares	Cepa 1751	Diseminación metastásica
5	Jorge y Col. 1946 (18)	Chaco paraguayo	38a M.	Pie derecho	No se obtuvieron	Diseminación metastásica?
6	Prado, J Insausti y Matera (19)	Cordoba	24a M.	Estado inicial gripal. Meningitis	Cepa 695	Diseminación metastásica
7	Basombrio, I. y col. (20)	Rio Colorado (Rio Negro)	24 M.	Pulmón y huesos de las extremidades	Cepa 696,5	Forma metastasica

Negroni, P., Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rix. et Gil.



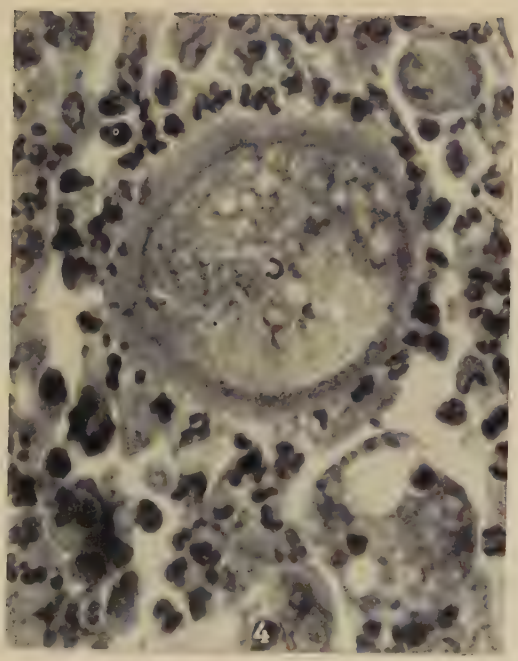


Fig. 1, Colonias de *Coccidioides immitis* (cepa 1751) en agar sangre al cabo de 8 dias de incubación a 30° C.

Fig. 2, Colonia de la cepa 696,5 en agar-sangre al cabo de 8 dias de incubación a 30° C.

Fig. 3, Aspecto microscópico del *Coccidioides immitis* en donde se aprecia el micelio de fructificación consistente en entosporos separados par células vacîas (cepa 696,5).

Fig. 4, *Coccidioides immitis* (cepa 696,5) en las lesiones experimentales del cobayo. Parásito adulto con endosporos quisticos y cuya membrana está erizada de formaciones radiadas acidófilas.

Satelitismo microbiano: Actinomyces israeli-Streptococcus sp.

por el Dr. P. NEGRONI y C. A. N. DAGLIO.

(Instituto Bacteriologico „Malbran", Buenos Aires).

(8.6.1948).

Recientemente, sembrando en tubos de agar blando glucosado en columna, el material extraido de un foco actinomicósico cervico-facial, hemos tenido la oportunidad de observar en los cultivos de 48 hs. de incubación a 37° C. el fenómeno particular que relatamos en este trabajo.

Como puede apreciarse en la fotografia que lo ilustra, se desarrollaron colonias típicas de *Actinomyces israeli* (KRUSE, 1896) algo mayores de 1 mm. de diámetro, multilobuladas, compactas, blanquecinas, rodeadas de una constelación de pequeñas colonias lenticulares.

Nuestra primera impresión fué la de que se trabata de un hecho ya señaldo por NEGRONI y BONFIGLIOLI (1) en ciertas cepas de *Act. israeli* de colonias poco compactas que, al desarrollarse en contacto con la pared del tubo, se presentaban con un nucleo central denso rodeado de numerosísimas colonias diminutas, como si hubieran estallado al contacto de la resistencia ofrecida por el vidrio. Sin embargo examinando más detenidamente este aspecto particular del desarrollo pudimos comprobar que se extendía a casi todas las colonias de *Actinomyces,* tanto las desarrolladas en contacto con las paredes del tubo como las situadas en el interior.

Observando bajo el microscopio el material tomado de la colonia grande central y de las pequeñas satélites, nos sorprendió el hallazgo de que la primera era, efectivamente, un *Actinomyces,* pero las segundas correspondian a un *Streptococcus sp.* Se trataba pues de un caso de satelitismo desarrollándose las colonias del *Streptococcus* a varios milímetros a la redonda de las de *Actinomyces,* como si este último microorganismo sintetizara cierto factor difusible, necesario par el crecimiento del *Streptococcus.*

En el fenómeno de satelitismo descripto por GRASSBERGER en 1897, el *Haemophilus influenzae* dependía de cierto factor sintetizado por el *Staphylococcus,* designado posteriormente como factor V e identificado por LWOFF a la coenzina de WARBURG y CHRISTIAN (trifosfopiridin-nucleótido).

En nuestro caso se trata de un *Streptococcus* procedente, posiblemente, de la boca que depende para su desarrollo de un factor sintetizado por el *Act. israeli.*

Según los datos bibliográficos que hemos obtenido, RANE y SUBBAROW (citados por KOSER y SAUNDERS, 1938) demostraron que una cepa de *Streptococcus* hemolítico requería para su desarrollo una mezcla de glutatión, tiocromo, flavina, ácido nicotínico, betaína, glucosamina y un precipitado cálcico alcohólico de extracto de hígado. Según PETERSON y PETERSON (3) el *Streptococcus* hemolítico puede sintetizar la tiamina, pero el *Streptococcus salivarius* carece de esta propiedad y fué, precisamente, utilizado por NIVEN

y SMILEY (4) como método biológico para la determinación de la vitamina B_1. KLIGER GROSSOWICZ y BERGNER (5) demostraron que ciertas bacterias requieren ácido nicotínico y tiamina en un medio de cultivo glucosado. SNELL (6) confirmó los resultados de Peterson y Peterson comprobando que el *Str. salivarius* requiere tiamina o cocarboxilasa (pirofosfato de tiamina). Es sabido la importancia que tiene esta coenzima en el metabolismo de los hidratos de carbono, por catalizar la oxidación del ácido pirúvico. Ciertos microorganismos como la levadura pueden sintetizarla a expensas de la tiamina y los fosfatos, pero debido al tamaño mayor de su molécula (incapaz de atravesar la membrana celular), no utilizan la cocarboxilasa presente en el medio de cultivo.

De lo expuesto dedujimos que nuestro *Streptococcus* fuera, probablemente el *Streptococcus salivarius* que necesita la tiamina como factor de crecimiento. Desgraciadamente no hemos podido obtener su cultivo y por consiguiente clasificarlo.

Recordaremos que la tiamina o vitamina B_1 contiene, según la fórmula establecida en 1936, el núcleo pirimidina unido al nucleo tiazol y que las pirimidinas y purinas son constituyentes esenciales del ácido nucleico. La tiamina conserva sus propiedades por calentamiento en medio ácido, pero las pierde por igual tratamiento en medio alcalino.

Faltaba, pues, indagar si ciertos *Actinomyces* con capaces de sintetizar la tiamina. Orr y READER (7) demostraron que el *Act. coralinus* requiere la presencia de vitamina B_1 en un medio de cultivo mineral para su desarrollo y lo utiliza ron como método biologico para su determinación. MACKINNON (8) observó, por el contrario, que el *Act. albus* estimulaba el crecimiento del *Trichophyton discoides* en un medio sintético y permitía el del *Phycomyces blakesleeanus* y, como obtuviera los mismos resultados mediante la adición de tiamina, dedujo que el *Act. albus* sintetizaba esta substancia.

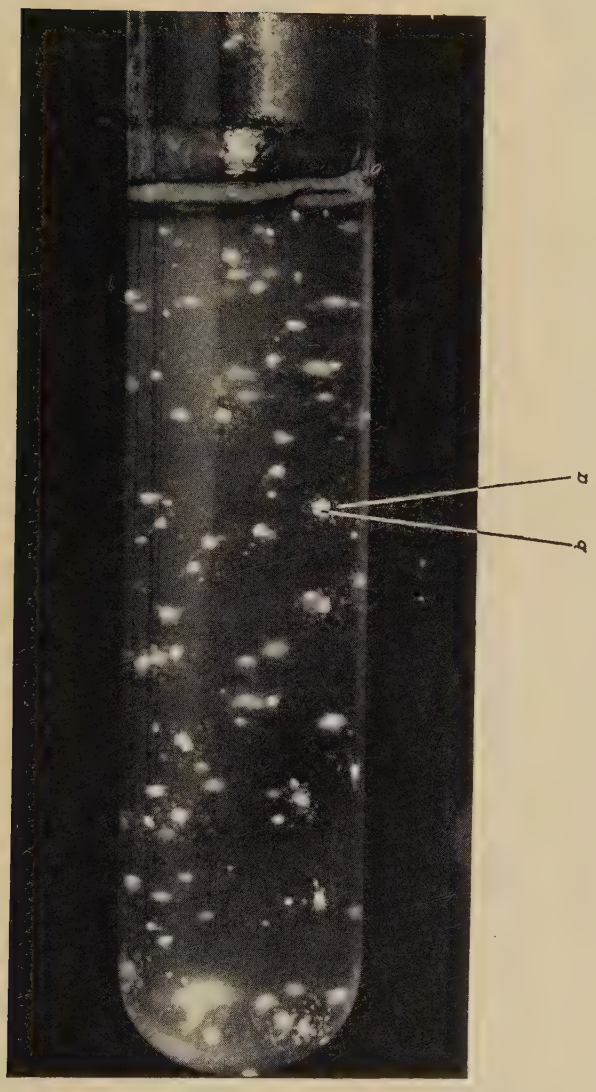
De extraordinario interés resultan las investigaciones de BRECHER y WIGGLESWORTH (15) quienes revelaron que existen microorganismos simbióticos en insectos chuñadores que se alimentan de sangre durante todo su ciclo vital (RHODIUS y *Triatomas*). Estos autores aislaron de la cloaca de adultos y ninfas de *Rhodnius* un *Actinomyces,* designado por ERICKSON *Act. rhodnii* cuya presencia parece necesaria para las mudas y la reproducción y que, según sus experiencias, se debe a que el *Actinomyces* en cuestión provee del complejo vitamínico B necesario para que pueda actuar la hormona de las mudas.

Nuestras experiencias: Con el objeto de demostrar que el *Act. israeli* sintetiza, probablemente, la tiamina, obtuvimos su desarrollo en caldo glucosado (anaerobiosis), lavándolo por centrifugación con solución fisiológica dos veces. El sedimento obtenido fué suspendido en solución fisiológica y dividido en cuatro lotes: a) suspensión no calentada, b) suspensión calentada a 70° C durante media hora, c) suspensión adicionada de hidrato de sodio (0,1 ml. de OHNa N/1 para 2 ml. de suspensión) calentada como la precedente y d) igual que la anterior pero adicionada de solución normal de HCl. El material c) y d) fué neutralizado después del calentamiento.

Por otro lado preparamos el siguiente medio de cultivo mineral: sulfato de magnesio 0,5 g., fosfato monopotásico 1,5 g., adicionado de 10 g. de glucosa y 1 g. de asparagina para 1 litro de agua destilada y distribuído en volumen de 20 ml. en frasquitos de Erlenmeyer de 50 c.c. de capacidad. Todos los frasquitos fueron sembrados con igual volumen de una suspensión en agua destilada de esporos de un cultivo de *Phycomyces blakesleeanus,*

TABLE XVII

P. NEGRONI Y C. A. N. DAGLIO
SATELITISMO MICROBIANO



disponiendo nuestra experiencia por cuadruplicado en la siguiente forma: 1) medio básico adicionado de 1 ml. de solución fisiológica, 2) adicionado le 1 ml. de suspensión de *Act. israeli* de una opacidad equivalente al tubo n° 3 de la escala de McFarland, 3) adicionados de 1 ml. de la suspensión de *Actinomyces* calentada a 70° C. media hora, 4) id. en medio alcalino y 5) id. en medio ácido.

Resultados: El desarrollo fué casi nulo en los medios 1) y 4) y bueno en los restantes.

Comentario

Del resultado de nuestras experiencias deducimos que el *Act. israeli* sintetiza una substancia hidrosoluble, puesto difunde en el medio de cultivo, que permite el desarrollo de un *Streptococcus sp.* ocasionando el fenómeno del satelitismo.

Esta substancia es, probablemente la tiamina, por los siguientes motivos: a) es un factor de crecimiento para el *Streptococcus salivarius,* b) permite el desarrollo del *Phycomyces blakesleeanus* en un medio de cultivo deficiente y sabemos desde los estudios de SCHOPFER (1935) que este hongo necesita para vegetar en un medio sintético la presencia de la vitamina B_1, c) la tiamina es necesaria para ciertos microorganismos cuando la glucosa está presente en el medio de cultivo y nuestro fenómeno de satelitismo fué precisamente observado en agar blando glucosado, y d) la substancia sintetizada por el *Act. israeli* se destruye, como la tiamina, por calentamiento en medio de alcalino resistiendo, en cambio, el calentamiento en medio ácido.

Résumé

Nous avons observé le phénomène de satellitisme d'un *Streptococcus sp.* provenant de la bouche (probablement le *Streptococcus salivarius*)' vis-à-vis de l'*Actinomyces israeli.* Nous croyons que l'*Act. israeli* synthétise une substance hydrosoluble, diffusible dans le milieu de culture qui permet le développement du *Streptococcus.* Cette substance est, probablement, la thiamine puisqu'elle est un facteur de croissance aussi pour le *Phycomyces blekesleeanus* et elle est détruite par le chauffage en milieu alcalin.

Bibliografía

1 Negroni, P. and MBonfiglioli, H., J. Trop. Med. & Hyg., 1937, **40**, 226. —
2 Koser, S. A. and Saunders, F., Bact. Rev., 1938, **2**, 99. —
3 Peterson, W. H. and Peterson, M. S., Bact. Rev., 1945, **9**, 49. —
4 Niven, C. F. Jr. and Smiley, K. L., J. Biol. Chem., 1943, **150**, 1. —
5 Kliger, I. G., Grossowicz, N. and Bergner, S., Proc Soc. Exp. Biol. and Med., 1943, 52, 332 and J. Bact. 1943, **46**, 399. —
6 Snell, E. E., Ann. Rev. Bioch., 1946, **15**, 375. —
7 Orr-Ewing, J. and Reader, V., Bioch. J. 1928, **22**, 440. —
8 MacKinnon, J. E., Bull. Torrey Bot. Club, 1942, **69**, 21. —
9 Sinclair, H. M., Bioch. J. 1938, **32** (2), 2185. —
10 Knight, B. C. J. G., Bioch. J. 1937, **31** (1), 966. —
11 Fildes, P., Lancet, 1940 **238**, 955. —
12 Schopfer, W. H., Plants and vitamins. Chronica Botanica Co. N. York, 1943. —
13 Welch, A. D., Physiol. Rev., 1945, **25**, 687. —
14 Woolle, D. W., Science, 1944, 100, 579. —
15 Brecher, G. and Wigglesworth, V. B. Parasitology, 1943—1944, **35**, 220. —

Hongos blastosporados de los esputos

por el Dr. P. NEGRONI y C. A. N. DAGLIO.

(Instituto Bacteriológico „Malbrán", Buenos Aires).

(8.6.1948).

En un trabajo anterior, presentado al Congreso de Epidemiología, comunicamos el estudio de la flora micológica de los esputos y su interpretación, asi como los antecedentes bibliográficos que pudimos consultar.

En esta oportunidad nos vamos a referir al estudio en particular de los hongos brotantes, llamados también levaduriformes o blastósporados.

De 100 esputos que nos proporcionaron cultivos positivos de estos hongos, 84 contenían diversas especies del eénero *Cándida* y 16 *Torulopsis.*

De los cultivos de *Cándida,* 54 fueron estudiados detenidamente para determinar la especie con el siguiente resultado:

Cándida albicans (Robin) Berkhout: 31 cepas (57,40 %).
Cándida tropicalis (A. Cast.) Berkhout: 11 cepas (20,37 %).
Cándida krusei (A. Cast.) Berkhout: 7 cepas (12,96 %).
Cándida parapsilosis (Ashf.) Langeron et Talice: 2 cepas (3,70 %).
Cándida Guilliermondi (A. Cast) Langeron et Guerra: 1 cepa (1,85 %).
Cándida zeylanoides (A. Cast.) Langeron et Guerra: 1 cepa (1,85 %).
Cándida lipolytica (Harrison) 1 cepa (1,85 %).

Para efectuar la determinación de las especies nos ha servido de guia el tratado de DIDDENS y LODDER (1942) comprobando, con cierta frecuencia, desviaciones del tipo „standard" en algunos de los caracteres macromorfológicos de los cultivos o de la actividad bioquímica que resumimos a continuación.

Cándida albicans: 4/31 cepas formaron islotes en el mosto de cerveza líquido y 2/31 pelicula. 16/31 el auxanograma de la urea fué negativo; 2/31 el auxanograma del sulfato de amonio fué negativo y en 7/31 se obtuvo resultado negativo para el sulfato de amonio y la urea. 28/31 cepas coagularon la leche y 15/31 se desarrollaron en el medio con alcohol etílico.

Cándida tropicalis: Auxanograma del nitrógeno: 4/11 negativo para la urea y 3/11 negativo para la urea y sulfato de amonio. 5/11 cepas coagularon la leche.

Cándida krusei: Auxanograma del nitrógeno: 1/7 negativo para la urea, 1/7 negativo para la urea, sulfato de amonio y asparagina, 1/7 negativo para la urea y sulfato de amonio. 4/7 no coagularon la leche y 1/7 no se desarrolló en el medio con alcohol etílico.

Cándida parapsilosis: 1/2 formó película en el mosto de cerveza, y las dos cepas coagularon la leche.

Cándida Guilliermondi: Auxanograma del nitrógeno negativo para el sulfato de amonio y la urea.

Cándida zeylanoides: licuó tardiamente la gelatina (al cabo de 1 mes) y coaguló la leche.

Cándida lipolytica (diagnóstico de probabilidad): El auxanograma del N fué negativo para el sulfato de amonio, urea y asparagina; no se desarrolló en el medio con alcohol etilico ni modificó la leche.

De las cepas de *Torulopsis* únicamente se estudiaron detenidamente 2 cepas que fueron clasificadas como *T. pulcherrima* (Lindner) Sacc. El auxanograma del N fué negativo, en ambas cepas, para el sulfato de amonio, urea y asparagina.

La inoculacion intraperitoneal al ratón de material de cultivos en mosto, nos ha revelado que las cepas de *Cándida* albicans, tropicalis, krusei y parapsilosis son frecuentemente patógenas.

Consideraciones

Según nuestra experiencia, *Cándida albicans* es el hongo blastosporado que más frecuentemente parasita al hombre determinando, a menudo, lesiones cuando encuentra un terreno favorable para su vegetación. Este enunciado se cumple especialmente a nivel de los pliegues cutáneos y raramente en las mucosas.

Llega a las cavidades naturales, desde el mundo exterior, sobre todo por las frutas que se consumen crudas y por el mecanismo de contaminacion por gotitas, por las manos sucias y, tal vez, por los moscas.

NEGRONI (1934-1935) reveló que más de 30 % de las mujeres embarazadas de término y 9 % de las no embarazadas albergan en la vagina *Cándida albicans* y NEGRONI y FISCHER, efectuando cultivos de materias fecales de 50 enfermos tomados al azr de un servicio de cirugía, aislaron 34 cepas de *Cándida* representadas por las siguientes especies: 15 *C. Krusei*, 7 *C. albicans*, 4 *C. zeylanoides*, 3 *C. tropicalis*, 3 *C. parakrusei*, y 2 *C. Chalmersi*.

En la cavidad bucal de personas aparentemente sanas, KNIGHTON (1939) obtuvo cultivos de *C. albicans* 23,9 %, *C. parapsilosis* 3,4 %, y *C. Krusei* 3,4 %.

MIRMAN (1933) y WEEDON y colaboradores (1937) (citadospor NEGRONI, P. Dermatomicosis, 1942), ALMEIDA, LACAZ y BARROS (1945) aislaron hongos levaduriformes, frecuentemente *C. albicans* y *C. Krusei*, de las vias biliares.

Repetimos que en esta oportunidad no pretendemos efectuar una revisión completa de la bibliografía sobre este tópico por haber sido ya expuesta en trabajos anteriores, sino traer a colación algunos datos ilustrativos. En efecto comprobamos que, por orden de frecuencia, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. Krusei* están presentes en los esputos y en la boca, resultados que coinciden con los consignados por BURT y KETCHIN (1941) y por CATANEI 1945).

En cuanto a la flora intestinal varía ligeramente debido, probablemente, a diferencias de adoptación según las especies, pero que también figuran entre las más frecuentemente encontradas *C. albicans, Krusei, tropicalis* y *zeylanoides*.

Estos datos confirman los resultados expuestos por JACKSON (1930) en el sentido de que la flora del esputo representa, como la intestinal, una prolongación de la flora bucal.

Resumen

De 100 esputos que proporcionaron cultivos de hongos blastosporados (o levaduri formes) 84% contenían diversas especies de *Candida* y 16% de *Torulopsis*. El estudio de 54 cepas de *Candida* arrojó la siguiente distribucion por especies: *C. albicans* 57,40%, *C. tropicalis* 20,37%, *C. Krusei* 12,96%, *C. parapsilosis* 3,70% y *C. Guilliermondi, Czeylanoides* y *C. lipolytica* (probable) cada una representada por 1,85%. Las dos cepas de *Torulopsis* estudiadas, fueron clasificadas como *T. pulcherrima*.

Creemos que la flora del esputo representa, como la de las materias fecales, una

prolongación de la flora bucal y que el clínico debe confirmar sus resultados por el estudio del producto de aspiración bronquial.

Resumé

De 100 crachats dont les cultures ont été positives pour des champignons levuriformes nous avons trouvé 84% de *Candida* et 16% de *Torulopsis*.

L'étude mycologique complet de 54 souches de *Candida* nous a révélé la suivante distribution par espèce; *C. albicans* 57,40%; *C. tropicalis* 20,37%; *C. Krusei* 12,96%; *C. parapsilosis* 3,70%; *C. Guilliermondi* 1,85%; *C. zeylanoides* 1,85% et *C. lipolytica* (probable) 1,85%. Les deux souches de *Torulopsis* etudiées ont été classées comme *T. pulcherrima*. Nous avons trouvé certains déviations des types de *Candida* et *Troulopsis* selon Diddens et Lodder, spécialement dans les résultats des auxanogrammes de l'azote.

Nous croyons que la flore du crachat, représent comme celle des fèces, une prolongation de la flore buccale et que le clinicien doit confirmer les résultats obtenus avec l'examen du produit de l'aspiration bronchiale.

Nota: Agradecemos: a los médicos de los servicios de los profesores Drs. CARLOS FONSO GANDOLFO y RAÚL VACCAREZA y a los Drs. N. LOIZAGA, LUCIO C. SANGUINETTI y a los médicos de la Liga Argentina contra la Tuberculosis del Hospital Israelita por el envío de material.

Bibliografía

Almeida, F., Lacaz, C. y Barros, O., Rev. Inst. A. Lutz, 1945, **5**, 337.
Artagaveytia-Allende, R., Arch. Uruguayos, Med. Cir. y Especialidades 1944, **25**, 148.
Burt, K. L. and Ketchim, H. M., Amer. J. Trop. Med., 1941, **21**, 427.
Catanei, A., Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 1945, **23**, 45.
Diddens, H. A. et Lodder, J., Die anasporogenen Hefen. II. Teil. N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij. Amsterdam, 1942.
Lodder, J., Die anasporogenen Hefen. Erste Hälfte. id. 1934.
MacKinnon, J. E., Zimologia médica. Montevideo. Impr. El Siglo Ilustrado, 1946.
Negroni, P., Dermatomicosis. A. Lopez. Buenos Aires, 1942.

Funghi lievitiformi isolati dalle ovoteche di Periplaneta orientalis L.

di

Maria Giulia Ronzoni

(dall'Istituto di Anatomia patologica della Università di Milano e dal Centro di micologia umana e comparata di Milano-Pavia).

(10.6.1948).

NOTIZIE STORICHE

Nel 1887 Blochmann osservava nel corpo adiposo di un blattide, la *Periplaneta orientalis,* cellule stipate da bastoncini dritti o spesso anche incurvati, lunghi 5—7 micron, ammucchiati a fasci. Per corpo adiposo intendeva tutta la massa di grasso intra ed extra celomatico delle Blatte. Le cellule contenenti i bastoncini (i batteriociti) furono osservate constantemente in ogni animale esaminato. I rapporti tra batteriocita e batteriocita erano pure constanti, in quanto tali elementi si disponevano in catene allineate su un' unica fila circondata da cellule adipose. Pure costante la grossolana disposizione intracellulare dei bastoncini, [1]) in quanto essi invadevano completamente il citoplasma senza oltrepassarne i limiti e senza penetrare nel nucleo. L'A. ritenne tali bastoncini di natura batterica, ma non riuscì a coltivarli.

Blochmann dimostrò inoltre che i corpi endocellulari venivano trasmessi ereditariamente ai discendenti, ritrovandosi essi costantemente nelle uova e negli embrioni.

„Nel corso adiposo di *Pleriplaneta orientalis* e di *Blattella germanica* in numerose cellule poste centralmente si trovano formazioni a bastoncino, di forma regolare e di determinata grandezza, che si moltiplicano per scissione e possono così trasmettersi nell'embrione dove giacciono dapprima nelle lacune del dotto nutritizio per poi passare, prima della completa formazione del tubo intestinale, in certe cellule del corpo adiposo embrionale" (Blochmann).

Le ricerche degli A. A. che successivamente si interessarono all'argomento si svolgono su due linee di lavoro:

1) morfologia, natura, tentativi di coltura di corpi endocellulari;

2) trasmissione ereditaria degli stessi e precise ricerche embriologiche.

Tralascio di informare su questo secondo punto per il quale rimando al recentissimo lavoro di Borghese (Micopathologia *4,* 85—102, 1948) : riferirò sul tentativo dei molti ricercatori che si prefissero di determinare la natura dei corpi endocellulari.

Si può affermare che per molti anni (fino al 1906 quando Mercier assicurò di essere riuscito a coltivare il batteroide) tutti gli A. A. ottennero risultati negativi. Così Wheele (1889) Cholodowski (1891), Forbes (1892)

[1]) I bastoncini verranno poi chiamati dagli A. A. con nomi diversi: batteroidi, condri, corpi endocellulari, simbionti. Per evitare compromessi di terminologia preferisco designarli quali corpi endocellulari, ogni qualvolta non vi sia uno specifico orientamento dell'A. citato.

il quale, pur non riuscendo nella coltivazione, insistette sulla natura batterica di esso. Altri studiosi CUENOT (1892), PRENANT (1904), HENNEGUY (1904) sostennero che i corpi endocellulari non sono esseri viventi, ma prodotto del metabolismo cellulare del Blattide. SCHNEIDER (1902) parlò di „condri". Anticiperò dicendo che più tardi MILOVIDOV (1928) con la colorazione di WILKONSKI, e KOCH (1930) con altra colorazione, dimostrarono che accanto alle forme a bastoncino si possone differenziare anche i condri. Nel 1906 MERCIER ottenne i primi risultati positivi nella coltivazione dei batteroidi [2]). Dimostrato che essi si trovano constantemente nelle uova preferì tentarne la coltivazione usando materiale embrionale, dove è possibile una maggiore sterilità di prelievo. Infatti i Blattidi depongono ovoteche chitinose che proteggono gli embrioni da insulti esterni. MERCIER sostiene che la caratteristiche del bacillo da lui isolato sono quelle dei corpi contenuti nel batteriocita. Lo chiama *Bacillus Cuenoti:* per le sue caratteristiche lo riavvicina al *Bacillus subtilis* o al *B. Mesentericus* o al *B. Tirotrix.* Non si pronuncia sul quesito se abbia funzione simbiontica mutualistica o parassitaria rispetto all'animale ospite.

Dopo questo primo risultato positivo ecco una serie di dati negativi.

JAVELLY (1914), BUCHNER (1921), GLASER (1920) (primi esperimenti), HERTING (1921): ebbero risultati negativi controllando la prova di MERCIER.

Nel 1925 GROPPEGIESSER comunica di aver identificato la natura dei corpi endocellulari essendo riuscito a coltivarli. Da 63 ovoteche di *Periplaneta orientalis* e da 23 di *Blattella germania* vennero isolati: 43 volte un fungo, 21 volte un bacillo sporogeno, 4 volte una sarcina gialla. In 19 casi non si ottenne alcuna coltura. Le sarcine sono conformi alle comuni specie diffuse nell'aria. La loro presenza nell'interno delle ovoteche dimostra che il contenuto delle stesse non è sterile in tutti i casi. Il bacillo isolato assomiglia a quello indicato da MERCIER come *Bacillus Cuenoti.*

Molti esemplari di *Periplaneta* o di *Blattella* avrebbero, secondo il GROPPEGIESSER, nel tessuto grasso scarsissima o nulla quantità di bastoncini. In luogo di questi compare spesso un fungo che si comporta entro il corpo dell'animale esattamente come bacillo. L'A. sarebbe riuscito ad isolare il fungo dall'ovoteca e dal tessuto adiposo: lo stipite, che sembrerebbe essere un lievito, non fermenta gli zuccheri, non dà luogo a formazioni di alcool, e solo scarsamente ad acidi. Si tratterebbe di una forma *Torula.* I ceppi isolati da diversi animali si comportano in modo identico tanto dal punto di vista sierologico che colturale. Riporto la descrizione dello stipite fungino isolato.

„I funghi isolati dalle ovoteche di *Periplaneta* e *Blattella* ed in molti casi anche dal corpo adiposo hanno le seguenti proprietà: Le cellule sono ovali, lunghe all'incirca 3,5—4 μ e larghe 1,8—2 μ misurate su preparati secchi e colorati. Sui preparati freschi si possono sempre osservare goccioline oleose ed un vacuolo, talvolta. Con le diverse colorazioni e nei preparati all'inchiostro di china e al colargolo si può dimostrare un finissimo rivestimento mucoso. Le cellule sono quasi sempre situate isolatamente; le cellule figlie si staccano subito dopo la formazione dalla cellula madre. Il funga è facilmente colorabile coi colori all'anilina ed anche al Gram. su tutti i terreni comunemente usati ha un soddisfacente sviluppo. La gelatina viene fluidificata. Nelle colture per infissione si ha sviluppo alla superficie e dentro il

[2]) „Batteroide" fu il nome ambiguo tacitamente accettato da molti A.A. per indicare il bastoncino evidenziato nel corpo adiposo del Blattide di cri non si poteva dire con sicurezza se fosse batterio simbionte o formazione inorganica del metabolismo endocellulare.

canale di infissione. In nessun caso si è osservata produzione di gas, neppure con le più svariate specie di zuccheri; nelle culture liquide la soluzione si intorbida ben poco o niente del tutto. Sulla superficie dei mezzi nutritizi e contenenti zuccheri si ha talvolta la formazione di un finissimo rivestimento di isolate cellule fungine. Sul fondo si forma un deposito un po'mucoso. Sui comuni terreni nutritizi non venne mai osservata sporogenesi. Onde esaminare l'attitudine alla sporogenesi si insemenzò il fungo su un pezzo di gesso. Anche qui non fu osservata, neppure dopo molto tempo, formazione di spore, mentre i saccaromiceti coltivati per controllo contenevano spore in quasi tutte le cellule. Non si tratta quindi di un saccaromicete, bensì di una forma di *Torula*. Sui terreni dell'Agar le colonie diventano, dopo qualche ora, limpide come l'acqua; più tardi diventano simili a capocchie di spillo e assumono una colorazione bianco latte che non si altera neppure nelle vecchie colonie e nelle colonie per striscio. Degno di nota però il fatto che le colonie dei funghi si colorano intensamente di rosso carminio se si trovano in vicinanza di certe colonie di *Penicillium* dell'aria su vecchie piastre. I prodotti del metabolismo di certi funghi determinano dunque la formazione di una sostanza colorante rosso cupa delle colonie di funghi altrimenti bianche".

Non è facile potersi orientare basandoci sulla descrizione data dall'A. Quasi certamente si tratta di uno stipite di *Torulopsis* poichè non sporifica, è privo di apparato filamentoso, non fermenta gli idrati di carbonio. La notizia che le colonie in piastra si colorirebbero in rosa o in rosso per la vicinanza di colture di *Penicillium* dell'aria è molto strana e di dubbia e difficile interpretazione; non si può capire infatti se il suo stipite dapprima a colonie bianche passava poi invecchiando a colonie rosse (in tal caso dovrebbe trattarso di una specie di *Rhodotorula*) ovvero se le colonie rosse dall'A. non fossero a loro volta inquinamenti delle piastre.

A conclusione delle ricerche svolte dagli autori citati, BUCHNER (1930) nel libro „Tier und Pflanze im Symbiose" afferma che probabilmente gli schizomiceti da MERCIER e da GROPPEGIESSER sono i simbionti. Implicitamente quindi conclude che i corpi endocellulari appartengono al gruppo del *Bacillus subtilis*. Sempre nel 1930 usciva un lavoro di GLASER che per il primo dà un quadro morfologico completo del simbionte: „immobile non capsulato, Gram positivo, non acido resistente, lungo 2—5 μ, largo 0,5—1 μ, con la colorazione di Giemsa si evidenziano bande più chiare che segmentano il corpicciolo. Esiste inoltre polimorfismo (oltre le forme bacillari esisterebbero anche elementi cocciformi). Il simbionte è simile alle specie comprese nel genere *Corynebacterium* Lehmann e Neumann. Tentò poi la coltivazione del corpo endocellulare insemenzando su un terreno formato da sangue defibrinato, Agar, soluzione di destrosio al 10 %. Con questa tecnica GLABER ottenne spesso colture pure di germi che identificò quale *Corynebacterium Periplanetae*, var. *americana* compredente 3 tipi: O = II = III.

Il simbionte sembra così identificato: senonchè questi dati vengono ancora confutati da GIER (1947). In un lavoro molto accurato per precisione di tecnica e ricchezza di materiale, l'A. segnala e documenta che il terreno usata da GLASER è specifico per la coltivazione dei difteroidi. Quindi essi non si devono considerare provenienti dal tessuto delle Blatte e degli embrioni, ma elementi di inquinamento. GIER ha anche occasione di isolare dei lieviti dei quali trascura lo studio sistematco e biologico.

Conclude:

1°) E' molto improbabile che lieviti e schizomiceti coltivati si possano identificare con il simbionte delle Blatte.

II) E' dubbio che qualche ricercatore abbia finora coltivati i batteroidi.

III) E' certo che tutti gli elementi intacellulari studiati hanno le stesse caratteristiche. Probabilmente sono da includere nel genere delle *Rickettsiaceae.*

Osservazioni personali

Preliminari

L'argomento dei simbionti delle Blatte esula dal semplice quesito circa la precisazione sistematica del corpo endocellulare, che ritengo ormai dimostrato essere un microorganismo, per assurgere ad importanza biologica generale.

In questa mia prima ricerca ho ripetuto le osservazioni degli studiosi che mi hanno preceduto con indagine batterioscopica e batteriologica nell'intento della defizione sistematica dei simbionti. Circa le osservazioni batterioscpoiche non ho nulla da eegiungere a quanto è stato fino ad ora precisato reguardo la forma, la colorabilità, la topografia dei bateroidi nelle cellule del corpo adiposo di *Periplaneta Orientalis* e *Blattella Germanica.* Durante le osservazioni sia su strisci che su sezioni istologiche di corpo adiposo si osservano talora delle situazioni patologiche nei tessuti celomatici perintestinali e delle altre formazioni comprese nell'addome del Blattide. Così ho riscontrato una formazione che potrebbe essere definita col nome improprio di „Micetoma".

Questi reperti ci dimostrano che non raramente i blattidi sono parassitati da forme per ora non definite; ciò ha un'importanza pratica, perchè ogni ricerca colturale eseguita prelevando i batteriociti della Blatta adulta può portare ad inquinamento dei terreni colturali. Per tali ragioni dopo alcune prove di saggio col corpo adiposo, ho rivolto la mia attenzione soltanto al contenuto delle ovoteche, col presupposto che queste contengano i soli batteroidi simbionti ereditari.

Il prof. REDAELLI mi riferisce di alcune ricerche da Lui eseguite nel 1944 sullo stesso piano di questo lavoro: le colture del corpo adiposo hanno portato all'isolamento di non meno di quattro specie differenti di schizomiceti e di alcuni stipiti di lieviti forse riportabili ad un' unica specie. Le colture del contenuto delle ovotoche hanno permesso l'isolamento dei lieviti bianchi analogamente riportabili ad unica specie (almeno per quanto lascia presumere l'aspetto microscopico).

L'analisi degli stipiti isolati e la loro determinazione sistematica non ha potuto essere condotta a termine per eventi bellici. Ho ripreso ora le ricerche colturali eseguite usando il contenuto delle ovoteche.

Tecnica usata nel tentativo di isolamento e di coltivazione del simbionte

1) trattamento delle ovoteche

La Periplaneta orientalis depone un uovo difeso da un'ovoteca chitinosa della forma e dimensione di un piccolo fagiolo (circa cm. 0,8 x cm. 0,4). Pur lavorando nelle migliori condizioni di sterilità non si può escludere che lo uovo sia sterile, perchè germi patogeni e saprofiti delle Blatte possono passare nell'uovo quando questo migra dallo ovidotto nella vagina.

Ho sterilizzato la parete esterna della ovoteca (che viene raccolta nel terreno inquinato) immergendola per 30′ in cloruro d'argento 1/1000 e alcool a 95° in parti eguali. Ho saggiato la sterilità di essi lasciandoli in brodo nutriente per 48 ore a 38°. Con una pinza sterile comprimo i due poli dell'ovoteca: questa si apre lungo la cerniera di saldatura. Immergo l'ansa sterile nell'interno e prelevo il materiale.

2) tecnica dell'insemenzamento

Ho strisciato il materiale prelevato su terreno solidificato in provette a becco di clarino, avendo cura di frantumare il materiale e di distribuirlo sulla maggior area possibile. Preferisco dissociare il materiale direttamente su terreno invece che su vetrino (come consigliano gli A.A.) per evitare possibili e facili inquinamenti. Sempre per diminuire la probabilità di inquinamento evito la macerazione del materiale.

3) terreni di coltura usati

I tentativi di coltivazione dei simbionti sono stati fatti usando i seguenti terreni: *Agar glucosio 2 % — Agar carota — Agar sangue — Agar 2,5 % carota, Glucosio 3 % — Brodo — Brodo glucosio 1,5 % — Terreno ovomucoide.* —

Abbandonai l'agar glucosio — carota per l'impossibilità di discernere quale degli ingredienti era necessario per la crescita dell'elemento isolato; l'agar sangue diede risultati constantemente negativi. Dei risultati ottenuti con terrreno ovomucoide riferirò in altra sede, dovendo ricontrollare i risultati con nuove prove sperimentali.

4) microcolture

Come premesso, ho rivolto il mio studio sulla classificazione dei lieviti isolati delle ovoteche e per lo studio micromorfologico di essi ho allestito le microcolture secondo il metodo di RIVALIER-SEJDEL (modificato da Redaelli).

5) Colture monocitogenetiche

Per lo studio degli stipiti dei lieviti ho sempre provveduto alla purezza della coltura allestendo colture monocitogenetiche, partendo dallo striscio primitivo ottenuto direttamente con il materiale della ovoteca.

Nella tecnica ho seguito quella descritta da Redaelli usando l'apparecchio di KOBLEMUELLER e VIERTHALER.

(cfr. Redaelli P., 1934, L'applicazione del Plattenmanipulator Koblemueller e Vierthaler per la coltura monocitogenetica dei lieviti, Boll. Soc. It. biol. sperim., (9), 588.)

Risultati

Sono state osservate e trattate 40 ovoteche di *Periplaneta orientalis* con i seguenti risultati:

Da 16 ovoteche sono stati isolati schizomiceti di cui 13 riportabili al *Bacillus subtilis* e 3 a un *cocco* dell'aria.

Da 6 ovoteche, sei stipiti di lieviti (che qui verranno studiati e descritti).

18 ovoteche sono rimaste sterili.

1) Descrizione dello schizomicete isolato

Lo schizomicete isolato ha le seguenti caratteristiche:

la colonia su terreno solido forma un'abbondante patina gialla lucida che invade rapidamente (24 ore) tutto il terreno. Su terreno liquido si forma un abbondante velo superficiale con i margini aderenti alla superficie della provetta; sul fondo si forma un denso deposito.

All'esame microscopico si evidenzia un bastoncino lungo 4—6 micron, Gram negativo, non acido resistente, sporigeno. Le spore sono voluminose (2-3 micron) e elittiche.

Questo germe ha tutte le caratteristiche di quello isolate da MERCIER e da lui chiamato *B. Cuenoti* e allora identificato come il simbionte. Ma per le sue caratteristiche microscopiche e per la rapidità di crescita (anche sui terreni meno specifici) si deve escludere essere il simbionte. Si può ascriverlo invece al genere *Bacillus (B. subtilis)* e si può avanzare l ipotesi che esso possa vivere come saprofita e parassita nel corpo della Blatta. Ricordo ancora di avere osservato nel tessuto adiposo formazioni rotondeggianti a tipo di granuloma o di micetoma con elementi subtilis-simili.

2) Studi degli stipiti dei lieviti isolati

Come dissi i lieviti isolati furone 6 e dallo studio successivo risultó che 5 erano riportabili ad una unica specie, un sesto aveva differenti caratteristiche. Trascriverò separatamente le due speci:

CEPPI I = 2 = 3 = 4 = 5

a) Caratteri culturali

Agar glucosio e *Agar carota* (dopo 30 giorni a 25°). Colonia limitata allo striscio, spessa, densa, cremosa, superficie lucente di colorito cremeo sporco, opaca in trasparenza, margini lisci ampiamente mamellonati.
Brodo e *Brodo glucosio.* Sul fondo deposito finemente pulverulento e biancastro. Il liquido sovrastante si è mantenuto limpido e trasparente.

b) Caratteri microscopici

Da terreno solido. Cellule globose raramente rotonde, più frequentemente ovalari o elissoidali. Non cellule allungate in atteggiamento di pseudoife. Membrana bene evidente. Citoplasma omogeneo con qualche goccia più rifrangente. Le dimensioni si aggirano attorno a questi valori: lunghezza 5,5—6,5 μ, largheza 3—4 μ.
Da terreno liquido. L'esame del fondo mette in evidenza un quadro omogeneo costituito da cellule allungate, ovalari o elittiche, con numerosissime gemmazioni e dimensioni paragonabili a quelle dei terreni solidi. Rare cellule rotonde con membrana ispessita da riferirsi a elementi di resistenza.

c) Microcoltura Rivalier-Seydel

Le cellule hanno aspetto omogeneo. Sono globose, ovalari o elissoidali con granulazioni. Membrane non evidenti. Gli elementi sono raccolti in piccole colonie puntiformi. più addensate al centro. Mancano costantemente cellule in atteggiamento da pseudoife, le dimensioni delle cellule sono di 5—5,5 x 3—4 μ.

d) Caratteri biologici

Coagulazione del latte — negativa
Fluidificazione della gelatina — negativa
Fermentazione degli idrati di carbonio: fermentano i monosaccaridi (glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio), non fermentano i disaccaridi (saccarosio, maltosio, lattosio). (Vedi tabella 1).

TABELLA 1

Ceppo	Glucosio		Fruttosio		Mannosio		Galattosio		Saccarosio		Maltosio		Lattosio	
	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH
1	+	6,9	+	6,8	+	6,8	+	6,6	—	8	—	8	—	8
2	+	6,8	+	6,8	+	6,6	+	6,6	—	8	—	8	—	8
3	+	6,8	+	6,8	+	6,6	+	6,8	—	8	—	8	—	8
4	+	6,9	+	7,2	+	6,8	+	7,4	—	8	—	8	—	8
5	+	+	+	7,2	+	6,4	+	7,5	—	8	—	8	—	8

Assimilazione degli idrati di carbonio: negativa per il glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e lattosio.

Le caratteristiche morfologiche-microscopiche fondamentali, come il comportamento di fronte alla coagulazione del latte, alla fluidificazione della gelatina, alla fermentazione degli idrati di carbonio e alla assimilazione degli stessi fanno classificare i ceppi n. 1, 2, 3, 4, 5 come *Torulopsis* sp. Berlese [1]).

CEPPO 6

a) Caratteri culturali

Agar glucosio e *Agar carota* (dopo 30 giorni a 25°) Coltura molto abbondante che si estende al di fuori dello striscio in forma di patina cremosa densa di colorito cremeo. La superficie è liscia e lucente in alcuni tratti, mentre in altri appare rugosa e finemente cerebroide, grossolanamente striata nei sensi dei raggi fino a bordi modicamente sopraelevati e a margini leggermente mamellonati. In profondità scende una raggiera plumosa. Oltre i bordi si allungano sottili filamenti per lo spessore di circa 3—4 mm. *Brodo* e *Brodo glucosato.* Alla superficie sottile velo di coltura che si innalza sui bordi della provetta in modo non uniforme e formando margini irregolari. Sul fondo deposito finemente granuloso. Il liquido è uniformemente intorbidato.

b) Caratteri microscopici

Da terreno solido. Cellule globose quasi esclusivamente ovalari ma anche più raramente rotonde, con numerose gemmazioni di elementi allungati accennanti alla formazione di filamenti. Le blastospore sono spesso riunite in catenelle di 3—4 elementi o in rari complessi arbuscolari.

Le dimensioni delle forme ovali si aggirano attorno a questi valori: lunghezza 3—3,5 μ, larghezza 2—2,5 μ. Le cellule sono quasi tutte granulose nel citoplasma.

Da terreno liquido

1) *esame del velo superficiale.* Il velo è costituito da molte blastospore, globose, prevalentemente ovalari, analoghe a quelle descritte per il terreno solido e con le stesse dimensioni. Molto numerose le forme allungate che si potrebbero chiamare pseudo ife lunghe da 10 a 13 μ, larghe 2—2,5 μ. Rari i complessi arbuscolari.

2) *esame del fondo.* Le blastospore hanno le identiche caratteristiche che alla superficie, più saldamente riunite in catenella, rosette e piccoli arbuscoli con accentuazione dell'apparato filamentoso.

c) Microcoltura in Rivalier Seydel

Vegetazioni molto ampie che nella parte centrale, rarefatta, è costituita da microcolonie con raggiere di apparato filamentose oscillante tra i caratteri di *Blastodendrion, Mycotorula* e *Candida* in senso stretto. Alla periferia della colonia, vegetazione più densa con ricchezza di apparato filamentoso e arborescenza del tipo *Mycotorula* e *Mycotoruloides.*

d) Caratteri biologici

Coagulazione del latte — negativo

Fluidificazione della gelatina — negativa

Fermentazione degli idrati di carbonio: negativa per i monosaccaridi (glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio), e disaccaridi (saccarosio, maltosio, lattosio) (Vedi tabella 2.)

TABELLA 2

Ceppo	Glucosio		Fruttosio		Mannosio		Galattosio		Saccarosio		Maltosio		Lattosio	
	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	Gas	pH	G^{as}	pH
6	—	8	—	8	—	8	—	8	—	8	—	8	—	8

Assimilazione degli idrati di carbonio: negativa per il glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e lattosio.

[1]) H. A. Diddens u. J. Lodder, Die anasporogenen Hefen. I. Häfte. pag. 129.

Le caratteristiche morfologiche e microscopiche fondamentali come il comportamento di fronte alla coagulazione del latte, alla fluidificazione della gelatina, alla fermentazione degli idrati di carbonio e alla assimilazione degli stessi fanno classificare il ceppo n. 6 come *CANDIDA ZEYLANOIDES* (A. Cast.) Langeron et Guerra [1]).

Commento

Lo scopo della presente nota era in origine quello di tentare, con l'isolamento, la coltivazione e l'identificazione del simbionte delle Blatte. Il complesso delle prove batteriologiche eseguite non mi ha dato per nulla la sicurezza di aver isolato organismi identificabili con il simbionte, per cui le mie conclusioni non possono, sotto questo punto di vista, che collimare con quelle di GIER (1947). Infatti per quanto gli schizomiceti isolati possano essere riferiti vuoi al *B. Cuenoti* (germe del gruppo del *B. subtilis*) vuoi ai difteroidì, non esiste una prova che essi siano le espressioni saprofitarie del simbionte della Blatta. La grande facilità di inquinamenti ambientali nel corso di prove anche tecnicamente irreprensibili, la convinzione che nelle ovoteche della Blatta possano rintracciarsi germi congenitamente trasmessi dalla femmina oltre il simbionti, avvalora quanto sopra.

Con GIER ritengo non ancora escogitato il procedimento tecnico atto a ricondurre ad una vita ambientale i simbionti, la cui millenaria obbligatorietà di vita nelle cellule del corpo adiposo toglie forse la possibilità di un riadattamento esterno. D'altra parte posso pure dire di non aver elementi per affermare che i simbionti siano da riferirsi ad una Ricketsiacaea.

Il mio studio si è particolarmente soffermato sull'analisi degli stipiti fungini lievitiformi isolati dalle ovoteche nelle quali si trovano soli o accompagnati forse da schizomiceti (germi del gruppo del *„subtilis"*).

Dei due stipiti isolati, lo studio micologico ha dimostrato trattarsi di una specie di *Torulopsis*, riscontrata cinque volte e della *Candida Zeylanoides* riscontrata una volta. Altri A. A. riscontrarono lieviti nel corpo adiposo e nelle ovoteche delle Blatte, ma ai lieviti non può essere riferita la natura del simbionte.

Ritengo che il loro facile reperto sia da riferirsi al fatto che cellule lievito si riscontrano con facilità nei liquidi celomatici di molti esemplari di Blatta, in alcuni dei quali si riscontra talora un vero e proprio „Micetoma" da funghi lievitiformi. Non posso inoltre escludere, per quanto non ne abbia la dimostrazione diretta e definitiva, che cellule-lievito passino dalla madre entro le ovoteche.

Sommario

L, A. ha ripreso il tentativo di isolare dalle cellule del corpo adiposo delle blatte (Periplaneta orientalis e Blattella germanica) i simbionti con lo scopo di determinarue la natura. Il tentativo è fallito; lo studio è stato condotto su 40 ovoteche di Periplaneta orientalis; le colture hanno dato in una percentuale altissima l'isolamento di uno schizomicete che entra nel gruppo del B. subtilis e l'isolamento di due funghi lievitiformi. Da sei ovoteche sono state isolate cinque volte una *Torulopsis* sp. e una volta la *Candida Zeylanoides* (Cast.) Lang. et Guerra.

L'A. ritiene che questi funghi lievitiformi derivino dalla flora della cavità celomatica della Blatta, frequentemente inquinata e che passino facilmente nelle ovoteche.

[1]) H. A. Diddens u. J. Lodder, Die anasporogenen Hefen. II. Häfte pag. 298.

Summary

Yeast-like fungi isolated from the oothecas of Periplaneta orientalis

The A. retook the attempt of isolating from the cells of the fatty body of beetles (Periplaneta orientalis and Blattella germanica) their simbionts, in order to enlight their nature. The attempt failed; the study has been performed on 40 oothecas of Periplaneta orientalis; the cultures allowed in a highest rate the isolation of a schyzomycetes belonging to the B. subtilis group, and the isolation of two yeast-like fungi. From 6 oothecas have been isolated five times a *Torulopsis* sp. and once the *Candida Zeylanoides* (Cast.) Lang. et Guerra.

The A. thinks these yeast-like fungi to come from the flora of the often polluted celomatic cavity of beetles from which they might pass, easily, in the oothecas.

Bibliografía

Berlese, A., Gli insetti, Vol. I, Milano, 1909.
Blochmann, F., Z.f. Biol., **24**, 1—15, 1887.
Borghese, E., Mycopathologia, **4**, 85—102, 1948.
Brue, C. T. e Dun, R., Science, **101**, 336—337, 1945.
Buchner, P., Tier und Pflanze in Symbiose. v. capitolo: Symbiosen bei omnivoren Insekten. p. 556, Berlin, 1930.
Cuenot, L., Arch. de Biol., **14**, 293—341, 1892.
Forbes, S. A., Bull. Ill. State Lab. nat. hist. Art., 4, 17, 1892. Citato da Gjer, 1945.
Frankel, H., Z.f. wiss Zool, **119**, 53—66, 1921.
Gier, H. T., Biol. Bull., **71**, 433—452, 1936.
Gier, H. T., J. Bacteriology, **53**, 173—189, 1945.
Glaser, R. W., Biol. Bull., **39**, 135—145, 1920.
Glaser, R. W., J. exp. Med., **51**, 59—82, 1930.
Groppengiesser, C., Zentr. Bakt. Parassitenk., **64**, 495—511, 1920.
Henneguy, L. F., Les insectes, Paris, 1904.
Javelly, E., C. R. Soc. Biol., **77**, 413—414, 1194.
Lwolf, A., C. R. Soc. Biol., **89**, 945—946, 1923.
Mercier, L., C. R. Soc. Biol., **58**, 682—684, 1906.
Mercier, L., C. R. Soc. Biol., **62**, 758—759, 1907.
Milovidov, P. F., C. R. Soc. Biol., **99**, 1928.
Milovidov, P F., C. R. Biol., **99**, 1928.
Milovidov, P. F., Arch. Anat. Micr., **24**, 1928, Cit. da Buchner, 1930.
Neukomm, A., C. R. Soc. Biol., **96**, 306—308, 1927.
Neukomm, A., C. R. Soc. Biol., **96**, 1155—1156, 1927.
Philiptschenko, J., Russe Entomol, 1908, Cit. da Buchner, 1930.
Portier, Les Symbiontes, Paris, 1918.
Virtanen, A. J., Natur, **155**, 747—748, 1945.
Wolf, J., C. R. Soc. Biol., **91**, 1190—1182, 1924.
Wolf, J., C. R. Soc. Biol., **91**, 1182—1183, 1924.
Wollmann, E., C. R. Soc. Biol., **95**, 164—165, 1927.

Rhinosporidiosis

MILTON THIAGO DE MELLO

*(Osvaldo Cruz Institute *) and Army Veterinary School, Rio de Janeiro — Brazil)*

(5.7.1948)

Rhinosporidiosis is a relatively unusual tropical disease. In a recent paper (15) we have made a revision of the bibliography concerned. With its references and data accumulated since then we have tabulated 442 cases in man and 39 cases in domestic animals over the world, most of them in Asia, where the disease is not uncommon. More than a half of the cases were observed in India (Table I).

In spite of that number, higher than that observed in many other mycosis common to man and domestic animals, the disease is almost unknown and only referred in a few words in some specialized textbooks. It is probable that these scarce references are due to the fact that Rhinosporidiosis is in a general manner a benign disease. Nevertheless, there are some cases in the literature in which delicate surgical interventions were made, such as amputation of the lower limb, excision of the penis and excision of large facial regions; in other cases generalization of the polypi characteristics of the disease was observed; there is also a case of an abcess in the brain in which the spores of the fungi were observed (2).

The causal agent of Rhinosporidiosis is *Rhinosporidium seeberi* (WERNICKE, 1900 in Belou, 1903), SEEBER, 1912 (20), emend. ASHWORTH, 1923. The fungus was seen by MALBRÁN, in Argentina in 1892, but it was described only in 1900 by SEEBER (19).

There is only one etiological agent for the disease in man and in domestic animals. The following are synonimous:

Coccidioides observed by Seeber Wernicke, 1900;
Coccidium Seeberia Wernicke, 1900 in Belou, 1903 (6);
Rhinosporidium kinealyi Minchin & Fantham, 1905 (16);
Rhinosporidium equi Zschokke, 1913 (22);
Rhinosporidium ayyari Allen & Dave, 1936 (3);
Rhinosporidium amazonicum Aben-Athar, 1944 (1).

It is probable that *Dermosporidium hylarum* Carini, 1940 (9) is the same species adapted to *Hyla rubra*, a Neotropical tree-frog.

R. seeberi is a curious fungus that has challenged the mycologists who have had the opportunity of handling it. It has never been cultivated in spite of the attempts made by numerous workers and the claims of some of them that they had succeeded in doing so. With material from a case observed in a horse, we tried to cultivate the fungus in plain agar, horse blood agar, Sabouraud dextrose agar, Sabouraud peptone agar, Czapek-Dox agar, plain broth, bovine placenta broth and media containing horse dung in various amounts. The results of our experiences were always negative whether

*) Section of Mycology.

inoculating the raw material from polypi or after careful treatment of it in order to diminish contamination by bacteria and other fungi. The material was treated with penicillin in various amounts or by Rao's technique (18), with 5 % formaline during 3 minutes.

All attempts to reproduce the disease in domestic and laboratory animals and even in man (14), have been equally negative. We tried to reproduce the mycosis by injecting in various animals triturate material from the polypi containing a great number of sporangia and spores of *R. seeberi*. The inoculations were made in different organs: conjunctiva, nasal mucous membrane, aural mucous membrane, testicle, anterior chamber of eye; also intrafoetal, intraperitoneal and subcutaneous inoculations were made. In one instance we have made grafts in the testicles and epiploon of white rats. The inoculated animals were the horse, dog, rabbit, white rat, guinea pig, hamster and white mouse. Our results were always negative.

From the above reference we see that the mycosis is still obscure in most aspects. We know with certainty that the fungus exists in the polypi characteristics of Rhinosporidiosis and all evidence seems to indicate that it is responsible for the growths. In these polypi, histologically granulomata, the fungus assumes different morphological features which have been masterly studied and described by ASHWORTH (5).

The early phase is represented by a round corpuscle 2—10 μ in diameter with a thin wall membrane; this early phase was first described by SHREWSBURY (21). We were able to observe it in material fixed by Fleming's fluid.

In a next phase a larger organism is observed, about 12 μ in diameter, showing a double wall membrane and differentiated nucleus and cytoplasm. This early stage of the fungus evolves more and more toward a round organism ranging from 50 to 60 μ in diameter; the cytoplasm is crowded with lipidic storage material easily demonstrable by treatment with osmic acid (Fig. 1).

Then the nucleus division begins. The cytoplasm divides after many nuclear divisions and is arranged around the nuclei. The cytoplasm division occurs when there are about 2.000 nuclei. In this moment the cell is yet spherical having a diameter of 150 μ or more.

When the mitosis is proceeding a clear thickening of the wall membrane is observed at one point. The center of this thickening shows an opening called the pore (Fig. 2a). In some preparations we have observed a sort of lid closing the pore (Fig. 2b) but we could not give a definitive interpretation of this observation because we were unable to see it in many other preparations.

After the organism has reached its maximum development, it has a nearly spherical form and measures 300—350 μ in diameter. The wall membrane is double; the outer membrane is chitinous and the inner one is of cellulose; this latter thickens in a apreciable manner to constitute the region where the pore is observed.

The large sphere, entirely filled with small corpuscles, is called the sporangium. The small corpuscles are called spores and are very numerous, about 16.000—20.000 in each sporangium. The spores measure 7—9 μ in diameter. They show a differentiated nucleus and storage material arranged as spherules, 10—16 in number for each spore (Fig. 3).

When the sporangium is completely mature, i.e., when it has reached its maximum size, the spores escape slowly from it through the pore. If the surrounding pressure is greater the wall membrane ruptures and the spores

are scattered in the surrounding tissues. Normally it seems that the spores are thrown in the open cavities where the growths are localized, in general the nose cavity or lachrymal apparatus, so that one can easily observe the spores and even the sporangia in the nasal mucus or lachrymal fluid.

The process of liberation of the spores through the pore, when the sporangium is thrown off, in normal conditions, is an effect of osmotic tension differences. In one case we put on a slide, nasal mucus of a horse bearing nasal growths, dropped 10 % sodium hydroxide on it and covered it with a cover-glass; one ripe sporangium was put under close observation under the microscope; after a few minutes we clearly observed the slow and gradual exit of mature spores through the pore.

The spores within the sporangium do not show the same development. The more developed stay around the pore (Fig. 2c); in the opposite pole they are flattened and show minimum development.

Rhinosporidiosis is characterized by granulomata formation at the nasal mucous membrane in more than 50 % of the cases cited in the world literature. Other localizations in the mucous membrane are also observed such as on the pharynx, uvula, larynx, urethra and vagina. The polypi were also observed on the skin, either localized or in generalized manner. Subcutaneous and cerebral localizations are very rare.

The polypi are red in colour, friable, sessile ou pedunculated and bleed easily when touched. At first they are solitary but there is a tendency to multiple growths formation. In one case we observed the polypi scattered over almost all the nasal mucous membrane of both nostrils of a horse (Fig. 4). All the polypi showing these characteristics must be examined more accurately, no matter of the site in which they are observed. Frequent nasal bleeding should call the attention in order to make a more accurate examination of the patient.

The surface of the polypi shows whitish or yellowish small dots, not more than 1 mm in diameter, easily visible against the red surface. Each dot is a microabcess caused by the presence of a sporangium or is only the pure sporangium, without the leucocytic infiltration.

Diagnosis is very easily accomplished by symptomatology and specially by examination of the material of the polypi at the microscope even with a low power lens; one sees the general features of the tissues and numerous forms of the fungus (Fig. 5). The material can be examined between slide and cover-glass, mounted in any fluid suitable for examination of scales from mycotic lesions (Fig. 6) or even in water. For more accurate diagnosis and search of the peculiar features of the micro-organism, paraffin inclusion and special staining should be made.

The tissue reaction to the fungi is granulomatous. The microorganisms are localized in the connective tissue and seldom in the epithelial layer. Often giant cells surround the spores or fragments of micro-organism. Severe leucocytic infiltration by polymorphonuclear can be observed around the spores or sporangia or bits of them. It is of interest to point the reticle hyperplasia that can be seen in silver impregnation; argyrophile fibers make a basket or nest-like formation around the fungus; the net of these fibers is at first very loose but as soon as the micro-organism develops, is becomes more and more close and at later stages it seems to be a true membrane or capsule.

The first reference to Rhinosporidiosis in Brazil was made in 1930 (13). The next cases were seldom observed in man and in domestic animals. It is

Equator
T. of Capricorn
1-Montenegro, in Fonseca, 1930
2-Fialho, 1940
3-Bueno & Faria, 1941
4-Coelho, 1942
5-Aben-Athar, 1944
6-Capua, 1944
7-Mello, 1946
8-Morelle, 1946
9-Fialho, 1946
10-Mac Clure, 1946
11-Mello, 1947
Human cases
Animal cases

almost certain that a greater number of cases should be found if all nasal or conjunctival polypi excised in ophtalmological and oto-rhino-laryngological clinics would be properly examined.

Tables II and III summarize Brazilian cases of Rhinosporidiosis in man and in domestic animals, respectively 7 and 4 cases. All them were localized in the nasal mucous membrane.

Map I shows the geographic distribution of such cases.

Summary

In another paper the Author has presented a revision of the world literature on Rhinosporidiosis. With these data and other accumulated since then, he was able to compute the world casuistic of this mycosis as 442 cases in man and 39 in domestic animals.

After a few considerations on the mycosis and its etiological agent, together with some of his experiences on the subject, the Author summarizes the cases observed in Brazil both in man and in domestic animals.

BIBLIOGRAPHY

1 Aben-Athar, Jayme, 1944. Um caso de rhinosporidiose. Revista do Acadêmico de Medicina, Pará, Brazil, 2(3):3—7. Ib: Rev. Acad. Med., Pará, Brazil, 1946, 4(5):3—7 (Reprint). —

2 Alessandrini, 1926. Referred to in Ruiz, F. R. & Ocaña, T.—1930. Nueva observación sobre „Rhynosporidium seeberi". Quinta Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. del Norte, Jujuy, Argentina, 1:370—376. —

3 Allen, F. R. W. K. & Dave, M. L., 1936. The treatment of rhinosporidiosis in man based on the study of sixty cases. Indian Med. Gaz. 71(7):376—395. —

4 Almeida, Floriano, 1939. Mycologia medica. Estudo das mycoses humanas e de seus cogumelos. XII+710 pags., São Paulo, Brazil. —

5 Ashworth, J. H., 1923. On *Rhinosporidium seeberi* (Wernicke, 1903), with special reference to its sporulation and affinities. Trans. Royal Soc. Edinb., 53, Part II (No 16):301—342. —

6 Belou, P., 1903. Tratado de Parasitologia Animal: 62. 1a. ed., Buenos Aires. Translated in Ashworth (5). —

7 Bueno, P. & Faria, P. N., 1941. Rinosporidiose em muar. Arquivos Inst. Biol., São Paulo, Brazil, 12 (Nov.):297—302. —

8 Capua, Mário de, Considerações em torno de 6 observações de polipo sangrento do septo. An Paulistas de Medicina e Cirurgia, 1944, 47(4):351. —

9 Carini, A., 1940. Sobre um parasito semelhante ao „*Rhinosporidium*", encontrado em quistos da pele de uma „*Hyla*". Arq. Inst. Biol. São Paulo, Brazil, 11:93—96. —

10 Coelho, Barros, 1942. Um caso de rinosporidiose nasal. Resenha Clínico-Científica, (Lorenzini), São Paulo, Brazil, 11(12):521—524. —

11 Fialho, Amadeu da Silva, 1946. Localizações pulmonares da „Micose de Lutz' — Anatomia patológica e patogenia. Tése. 242 pags., 71 figs., 148 bibliog. ref. Rio de Janeiro, Brazil. —

12 Fialho, Amadeu; Silveira, Alair; Sampaio, Gastão; Chaves, Vinício — 1940. Um caso de rinosporidiose nasal (Nota prévia). O Hospital, Rio de Janeiro, Brazil, 17(6):945—946. —

13 Fonseca Filho, Olympio, 1930. A Quinta Reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional do Norte. Rev. Méd.-Cir. do Brazil, Rio de Janeiro, 38(1):2—22. —

14 Habibi, M., 1944. Contribution à l'etude de *Rhinosporidium seeberi*. Description de 16 cas observés en Iran. Pract. oto-rhino-laryng., 6(1):35—44. —

15 Mello, Milton Thiago de, 1946. Estudos sobre o *Rrinosporidium seeberi*. Tése. 131 pags., 19 figs., 239 bibl. ref. Rio de Janeiro, Brazil. —

16 Minchin, E. A. & Fantham, H. B., 1905. *Rhinosporidium kinealyi* n. gen., n. sp. a new sporozoon from the mucous membrane of the septum nasi of man. Quart. J; Micr. Sci., 49:521—532. —
17 Morelle, Orestes, 1946. Rhinosporidiose equina no Rio Grande do Sul. Bol. Diret. Prod. Animal do Rio Gr. do Sul, Brazil, 2(4):35—38. —
18 Rao, M. A. N., 1938. Rhinosporidiosis in bovines in the Madras Presidency, with a discussion on the probable modes of infection. Ind. J. Vet. Sci. & An. Husb., 8, Part III (Sept.): 187—198. —
19 Seeber, G. R., 1900. Un nuevo esporozoario parásito del hombre. Dos casos encontrados en pólipos nasales. Tesis. Univ. Nac. Bs. Aires. 62 pags. Sum; in Ashworth (5). —
20 Seeber, G. R., 1912. *Rhinosporidium kinealyi* et *Rhinosporidium seeberi*, une question de priorité. Ciencia Medica, Bs. Aires, Argentina, p. 10. —
21 Shrewsbury, J. F. D., 1933. Rhinosporidiosis. J. Path. & Bact., 36(3): 431—434. —
22 Zschokke, E., 1913. Ein Rhinosporidion beim Pferd. Schweizer Arch. f. Tierheilk., 55(12):641—650. —

Table I

Rhinosporidiosis in the world (*)

Countries	Human rhinosporidiosis		Animal rhinosporidiosis	
	Number of cases	Percent	Number of cases	Percent
AMERICA	(50)	(11.3 %)	(11)	(28.2 %)
Brazil	7	1.6 %	4	10.2 %
Argentina	14	3.2 %	2	5.1 %
Uruguay	2	0.4 %	5	12.8 %
Paraguay	10	2.3 %	—	—
Cuba	1	0.2 %	—	—
United States of America	16	3.6 %	—	—
AFRICA	(12)	(2.7 %)	(3)	(7.7 %)
South Africa	9	2.0 %	3	7.7 %
East Africa	3	0.7 %	—	—
EUROPA	(2)	(0.4 %)	—	—
Italy	2	0.4 %	—	—
OCEANIA	(1)	(0.2 %)	—	—
Philippine Islands	1	0.2 %	—	—
ASIA	(377)	(85.3 %)	(25)	(64.1 %)
Iran (Perse)	31	7.1 %	—	—
Siam	2	0.4 %	—	—
Federated Malay States	1	0.2 %	—	—
Ceylon	108	24.4 %	—	—
India	233	52.7 %	(25	64.1 %
Israel (Palestine)	1	0.2 %	—	—
Doubtful	1	0.2 %	—	—
Total	442		39	

(*) Modified from Mello (15)

Table II

Human rhinosporidiosis in Brazil

Author	Year	State	Patient				References
			Sex	Age	Profession	Country of birth	
Montenegro	1930	Sao Paulo	M	—	—	Brazil	4,13
Fialho & al.	1940(1935)	Rio de Janeiro	M	Aged	Gardener	—	4,12
Coelho	1942(1942)	Alagôas	M	59	Farmer	Brazil	10
Aben-Athar	1944(1940)	Pará	F	11	—	Brazil	1
Capua	1944	Sao Paulo	—	—	—	—	8
Fialho	1946	Rio de Janeiro	—	—	—	—	11
Mac Clure	1946	Rio de Janeiro	—	—	—	—	11

Obs: Numbers between parenthesis indicate the year of diagnosis; the outer numbers indicate the year of publication.

Table III

Animal rhinosporidiosis in Brazil

Author	Year	State	Patient					References
			Species	Sex	Age	Utilization	Country of birth	
Bueno & Faria	1941	Sao Paulo	Mule	M	—	—	Uruguay	7
		Rio Grande	Horse	M	6	Racing h.	Brazil	15
Mello	1946	do Sul						
		Rio Grande	Horse	M	—	—	Brazil	17
Morelle	1946	do Sul						
Mello (*)	1947	Sao Paulo	Horse	F	9	Saddle h.	Brazil	Unpublished

(*) A brief reference on this case was made by Alvim, G.S., in „Boletim Veterinário Militar", 1947, 1 (8): 4.

FIGURES

1 Several forms of *R. seeberi*, showing lipidic storage material fixed by Fleming's fluid. 110. After Mello (15).

2 Part of a mature sporangium of *R. seeberi*. a) Pore in the center of the thickening of the cellulosic layer b) Lid-like formation over the pore; c) Mature spores. 900 X. After Mello (15).

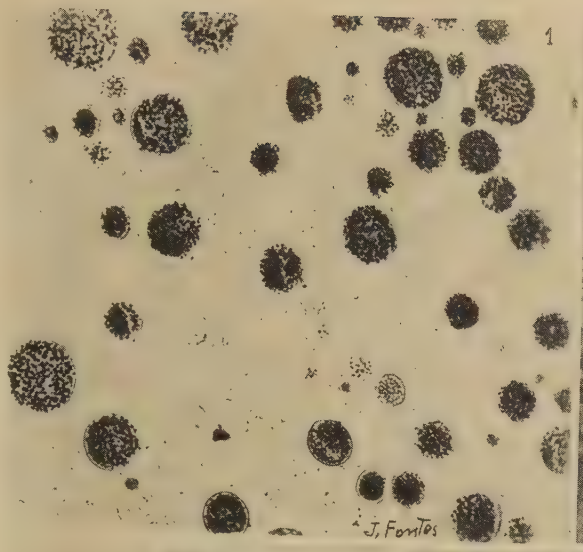
3 Spores of a ripe sporangium of *R. seeberi*, showing double wall and spherules. May-Grünwald. 1200 X. After Mello (15).

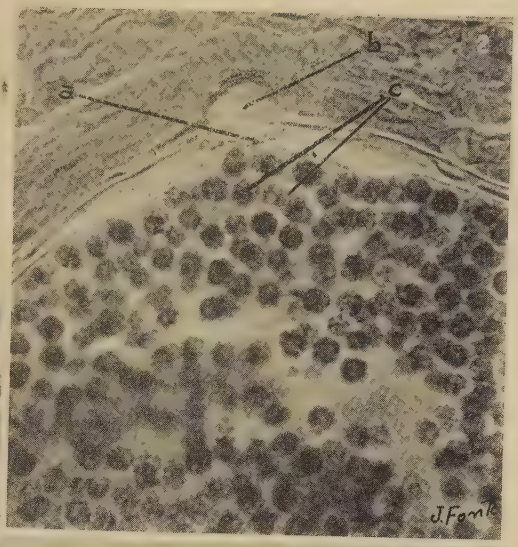
4 Section of right nostril o a horse bearing several rhinosporidial polypi. Original.

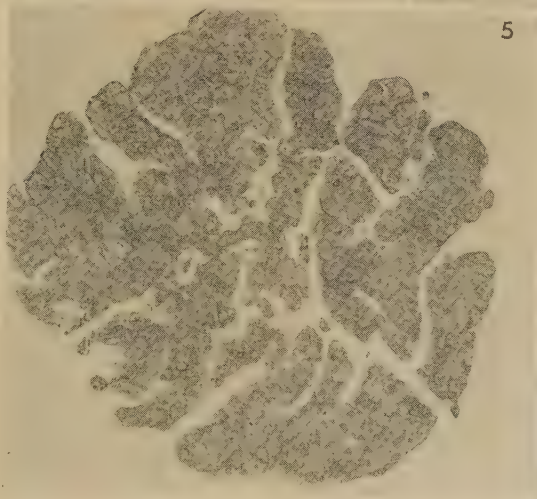
5 General feature of a rhinosporidial polypus. Kindness of Prof. Antonio Pires, Argentina. 5 X. After Mello (15).

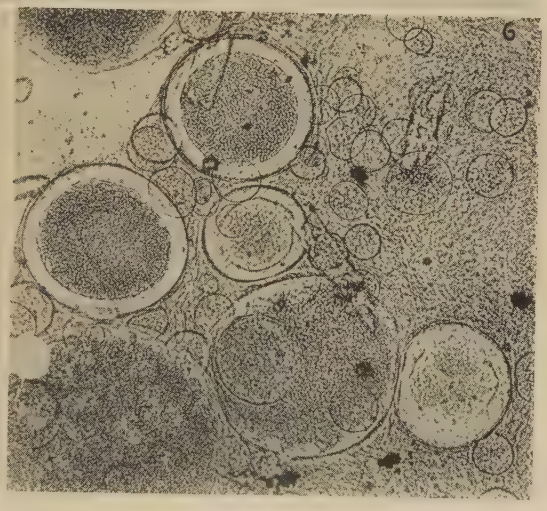
6 Various forms of *R. seeberi*. 10% sodium hydroxide. 120 X. After Mello (15).

MILTON THIAGO DE MELLO
RHINOSPORIDIOSIS









Candida in Sputum of Patients with Tuberculosis [1]

Virginia M. SCHWARTING [2]) and C. E. SKINNER [3]).

(4. 9. 1948)

The genus *Candida* is widely distributed in nature and has been found in many of the natural habitats of other microorganisms: (2, 4, 7) fresh and decomposing fruits and vegetables, dairy products, soil, wood products, sewage, and insects, for instance. The human body is the best known habitat and species of *Candida* are regularly found in the human mouth, digestive tract, respiratory tract and vagina. Even the pathogenic species, *Candida albicans,* is often found in these parts of the body of persons having no evidence of infection. One of the authors (7) has compiled the following data (Table 1) from the literature on the incidence of *Candida* in sputa of patients with or suspected of tuberculosis.

TABLE 1 [1])

Incidence of *Candida* in samples of sputum

Investigator	Kind of sputum sample	Number examined	Percentage of specimens with Candida (all spp.)	Percentage of specimens with C. albicans
Burt and Ketchum	Tuberculosis known or suspected	693	42	36
Fisher and Arnold	„	160	28	13
Jones	Various respiratory conditions	25	44	
Maher	Tuberculosis, known or suspected		10	
Marett	„	568	52	
Marett	„	2000	75	
Norris	„	210	8.5	
Weedon, Kenney and Shirk	„	55		9

[1]) From. Bact. Rev. Vol. 11, No. 4, p. 251. 1947.

[1]) Part of this work was completed several years ago under the direction of the late Professor Arthur T. Henrici.

[2]) Glen Lake Sanatorium, Oak Terrace, Minn. U.S.A.

[3]) Department of Bacteriology and Immunology, University of Minnesota, Minneapolis, Minn. U.S.A. Present address: Department of Bacteriology and Public Health, Washington State College, Pullman, Wash. U.S.A.

The differences in the incidence of *Candida* found by the various investigators is probably partly explained by actual differences in incidence and partly by differences in techniques employed for demonstrating the presence of these organisms.

We are able to add to the data presented above. The work was done at the Glen Lake Sanatorium, a large tuberculosis sanatorium close to Minneeapolis, Minnesota, U.S.A. Fresh Routine samples of sputum were obtained and were cultured at once in glucose-tartaric acid-beef-peptone agar (8) at pH 3.8. After isolation, cultures were stabbed in beef-peptone gelatin. The lack of typical "fir tree" growth indicated non-mycelial yeasts. The remainder were streaked on Benham's corn meal agar (1,8) to verify the mycelial nature of the yeast and the production of blastospores. From a total of 500 patients (one sample per patient) 107 sputa yielded yeasts and 8 of these were found to be non-mycelial or to produce ascospores on McKelvie's carrot gypsum agar. (8) The remaining 99 cultures were *Candida,* giving an incidence of 20%.

At first no attempt was made to separate species, but later 67 isolates were selected at random from the above 99 and were more carefully studied. We considered a yeast, which produced on corn meal agar, mycelium, blastospores and terminal chlamydospores, and which fermented glucose, galactose and maltose with gas, sucrose with acid only or with only a bubble of gas, and lactose not at all, to be typical *Candida albicans.* Nearly all fell into this category. A few isolates produced the chlamydospores and were otherwise typical save that they produced considerable gas from sucrose. Following DIDDENS and LODDER (2) we consider these also to be *C. albicans.* Actually the production of acid but not gas from sucrose in the EINHORN (SMITH), GUERRA, or DURHAM fermentation tube is very characteristic of most strains of *C. albicans,* but it is an artifact. VAN NIEL and COHEN (5) have shown that carbon dioxide is produced anaerobically, but in insufficient amounts to accumulate under the conditions.

A few physiologically typical isolates failed to produce chlamydospores on the single plate of corn meal agar used. It has been found that an occasional isolate of *C. albicans* does not produce chlamydospores at all readily even when freshly isolated unless the culture is first grown on blood agar. (MARWIN, unpublished data). Therefore we admit these few strains into the *C. albicans* category. Isolates which formed considerable gas from sucrose and did not form chlamydospores were not diagnosed as *C. albicans.* Since 57 out of the 67 isolates chosen at random belonged to this species, we estimate that 17% of all the 500 sputum samples contained *Candida albicans.*

To determine what effect the extent of the tuberculosis had upon the incidence of *Candida,* the series was divided according to the diagnosis of tuberculosis made upon the patients' entry to the sanatorium.

Briefly, a diagnosis of minimal tuberculosis infers that a very small amount of infiltration without demonstrable cavitation is present. Moderately advanced tuberculosis is considered involvement of one or both lungs with slight infiltration not exceeding the total volume of one lung, or severe infiltration exceeding a total volume equivalent to not more than one-third of one lung. Cavities, if present, do not exceed four centimeters in diameter. The diagnosis of far advanced tuberculosis indicates more extensive infiltration, and evidence of greater cavity formation than the moderately advanced cases.

TABLE 2

Relation of degree of tuberculosis to the frequency of *Candida* in sputum

Tuberculosis degree	Number of cases in total series	Number of cases in Candida series	Percentage of cases with Candida
Far advanced, with cavities	332	63	19.0
Far advanced, no cavities	5	0	0.0
Moderately advanced, cavities	98	21	21.4
Moderately advanced, no cavities	34	7	20.6
Minimal, no cavities	20	6	33.0
Miscellaneous diagnosis extra-pulmonary tuberculosis	11	2	18.2
Totals	500	99	

The divisions based on diagnosis of the patients in the total series, and of the patients whose sputa contained *Candida* are indicated in Table 2. As will be seen, Candidas are distributed among the various classes of diagnosis about equally. It is interesting to note, in this connection, that the degrees of tuberculosis seem to have no influence upon the incidence of *Candida*. This evidence seems to contradict the general opinion that the presence of a chronic debilitating disease such as tuberculosis tends to raise susceptibility to *Candida* infectation. It should be kept in mind, however, that this study includes a relatively small number of sputa, and there is no real evidence of any true "infection" with *Candida* in any case. A statistical analysis of the data likewise shows that while it can be safely assumed that in the present series, the incidence of *Candida* in moderately advanced and minimal cases is not less than in far advanced cases, it is unsafe to assume that it is greater. The X^2 value is 0.9.

$$X^2 = \frac{(a+b+c+d)\,(ad-bc)^2}{(a+b)\,(c+d)\,(a+c)\,(b+d)}$$

where a = moderate and minimal cases with *Candida*,
b = moderate and minimal cases without *Candida*,
c = advanced cases with *Candida*,
d = advanced cases without *Candida*.

For fairly conclusive evidence (95%) that there was a significant difference between the two series, the X^2 would have had to be 3.8 and for 99% assurance, 6.6. (3)

TABLE 3

Distribution of advanced cases of tuberculosis in percentages

Type of case	Series of 500 total cases	Series of 99 cases with Candida present
Total, far advanced cases	67.4 %	63.6 %
Total, moderately advanced cases	26.4 %	28.3 %
Total, advanced cases	93.8 %	91.9 %
Total, cases with cavities	86.0 %	84.8 %

Table 3 serves to emphasize the fact that the amount of tuberculosis, or the presence of cavities has little to do with the incidence of *Candida* in sputum. Note how closely the percentages of the series of patients with *Candida* follow those in the total series in regard to diagnosis and cavitation. Cavitation *vs.* no cavitation of pulmonary cases, $X^2 = 0.20$.

These figures indicate that advanced cases and cavitation were about as prevalent in the total series as they were in the *Candida* series. The differences between the two series are so slight that they can be regarded as having no significance.

From this series, it would be unwise to conclude that lowered resistance has little to do with the incidence of *Candida* in sputum. With such an intangible factor, a series of figures based upon degrees of resistance cannot be so readily produced. However, it is a fairly safe assumption that the entering patient has lower resistance than the outgoing or convalescent patient. The entering patient is probably being hospitalized as a result of his inability to work or to stay up any longer, tuberculosis being an exhausting disease. After he has spent a few weeks in bed, the patient usually feels somewhat rested, begins to gain weight and makes improvements insofar as his tuberculosis is concerned. These outward signs of improvement may well be evidence of increased resistance. Granted that they are, and considering the fact that the series of 500 cases contained both convalescent and newly admitted patients, a fairly large variation in degrees of resistance would occur in the present study. Taking these facts into consideration, no conclusion could be drawn on the role of resistance in the incidence of infestation by *Candida.*

If, however, cultures were made from a series containing only newly admitted patients, some evidence might be obtained as to the relation of resistance to susceptibility to *Candida* infestation. Such a series of cultures was made. Taking cultures from 100 newly admitted patients, 28 Candidas were isolated, or an incidence of 28 percent. This figure, though still within the range of reported normal throat *Candida* incidence, is somewhat higher than the incidence (20%) in the larger series of 500 cases. The X^2 value was found to be 3.36, which is slightly under the 3.84 required for the 95% reliability usually required for biological data. All we can say is that there is evidence that newly admitted patients are more likely to have *Candida*

in the sputum than the patients as a whole at the hospital, but that the evidence is not quite sufficient to draw definite conclusions. Similar results would have been obtained by chance alone slightly more than 5% of the times.

After the above data had been obtained, it was decided that further information should be obtained as to the ability of *Candida* to become implanted in the respiratory tract. Are they, as is sometimes implied, organisms that are transitory, with little ability to establish themselves as parasites, or do they tend to establish themselves in some individuals and not in others? Do some individuals resist such establishment of *Candida* as a parasite (pathological or otherwise) more than other individuals do? After *Candida* has disappeared from the sputum, does it tend to remain absent? To get such information, cultures were taken at monthly intervals from several patients for one year. Unfortunately we can report on only 94 patients. The remaining patients of the series either failed to raise sputum one or more months, or they were discharged or died, or for some other reason cultures were not examined once or oftener.

Table 4 shows the number of months out of 12 that the sputum of each individual yielded *Candida*. It also shows what the expected incidence would be if the number of positive sputa (285 out of 1128 examinations, that is, from 94 patients 12 times each) were distributed in a purely random manner.

TABLE 4

Incidence of *Candida* in sputum of tuberculosis patients on 12 consecutive monthly examinations

Number of samples positive for **Candida** out of 12	Number of patients in which **Candida** was found the number of times expressed in first column	Number of patients in which **Candida** would be expected by chance, the number of times expressed in first column
12	7	.000005
11	2	.0002
10	2	.003
9	2	.03
8	3	.2
7	3	1.1
6	5	3.8
5	3	9.7
4	3	18.2
3	5	24.3
2	4	21.8
1	16	11.9
0	39	3.0
Total	94	94.033205

It can be seen that the incidence of *Candida* in different individuals kept under essentially the same conditions is not due to chance. Some of the patients tend to harbor *C. albicans* and the parasite tends to persist. Other individuals tend not to become "infected" with the organism. Of 94

patients examined, the sputa yielded *Candida* 285 times out of 1128 examinations. Only .000005 patients would be expected to yield the organism all 12 times and 7 actually did so, and only 3 patients would be expected never to yield it in a single one of the 12 cultures, and 39 actually did not yield it. It is apparent that chance distribution is out of the question. We have no theory to explain why *Candida* tends to persist in some sputa and not in others. We merely state that it is not a matter of chance.

The data from these monthly examinations of the sputa of patients can be used to show more specifically, that the theory that the probability of finding the fungus bears no relation to past findings is untenable. Moreover it can be shown specifically that a positive finding tends to be followed by a positive finding and a negative finding by a negative finding. This latter is true, even when we consider only negative findings in patients who had within the previous year once or more times had *Candida* in the sputum.

We listed all monthly findings in which a positive finding was followed by a positive finding (a = 194), a positive finding by a negative finding (b = 111), a negative finding (from patients who had in the previous 12 months, shown at least one positive finding) followed by a positive c = 55) and a negative by a negative (d = 143). X^2 was found to be slightly over 9. The 95% reliability usually required for biological data is indicated by a X^2 of 3.841 and the 99%, a X^2 of 6.635. A positive or negative does not follow a positive or negative by chance, but bears some relation to the previous finding.

Had we included all the data, that is, the negative findings in all the months up to the time a positive was found, the results would have been more striking. However we wished to find out if there were a tendency for *Candida* to remain absent, after it had been present and had disappeared. This seems to be the case.

Discussion

The fact that about 20% of the sputa of tuberculous patients contained *Candida* and 17% *Candida albicans* requires no comment. It is very like the findings of many previous workers. But that *Candida* did not occur more frequently in advanced cases than in less advanced, and that cavitation did not predispose to *Candida* is surprising. It is definitely contrary to the usual opinion, but not as far as we can discover to any published data. However our data indicate but do not prove that incoming patients, who are usually "regressing" are more likely to harbor *Candida* than hospitalized patients who are, most of them at least, progressing toward a state of "arrested case". Also we have shown that *Candida* tends to persist when once found present in the sputum, and to remain absent after the yeast once disappears. Possibly these data indicate that the commonly held opinion that moniliases are diseases toward which malnutrition or debilitating disease predisposes, should be investigated objectively. Commonly held opinions may be found untenable when subjected to the cold arguments of copious data, objectively obtained.

One weak point of our investigation should be mentioned. No attention was given to the amount of *Candida* in the sputum, merely the presence or absence in the sample. This is a fault of nearly all the data in the literature on the incidence of yeasts, especially of *Candida,* in the various parts of the body. As one of the authors pointed out previously (7) SCHNOOR's data (6) on the incidence of *Candida* in feces is, to some extent, a notable

exception. Unfortunately the present work was done before the authors had read Schnoor's paper, and before they had the quantitative point of view. Had we set some quantitative standards, possibly there might have been quite different results on a correlation between the extent of tuberculosis for instance, and *heavy* infestation with *Candida albicans*. But we have no opinions on whether or not this would have been the case.

Summary

1. Species of *Candida* were isolated from 99 of 500 samples (20%) of sputum of patients in a tuberculosis sanatorium.
2. Sixty-seven cultures of the above 99 were selected for further study. Fifty-seven strains proved to be *Candida albicans*. Thus the incidence of *C. albicans* in tuberculosis sputa was estimated to be 17%.
3. There was no evidence that *Candida* is more prevalent in sputa of advanced cases of tuberculosis than in those of less advanced cases.
4. There was no evidence that the amount of cavitation has any bearing on the likelihood of the presence of *Candida*.
5. Some evidence, but not sufficient to be conclusive, indicated that *Candida* is more likely to occur in the sputa of new admissions to a tuberculosis hospital, than in those of patients that have been hospitalized for some time.
6. There is definite evidence that the incidence of *Candida* in tuberculosis sputa does not follow a chance distribution. On the contrary, this species tends to be found the following months after it has once been found, and to be absent the following months, after it has disappeared.

Sumario-Candida en esputo de tuberculosos

1. Especies de Candida fueron descubiertas en 99 de 500 muestras (20%) de esputos de pacientes en un sanatario para tuberculosos.
2. Sesenta y siete cultivos de los 99 fueron seleccionados al azar, y fueron estudiados más detenidamente.
   Cincuenta y siete de los 67 resultaron *Candida albicans*. En consecuencia, la incidencia de esta especie en esputos de tuberculosos se estimó en 17%.
3. No se hallaron evidencias de que *Candida* apareciese con más frecuencia en los esputos de pacientes con el mal muy avanzado que en los de pacientes con el mal menos avanzado.
4. No se halló correlación alguna entre la incidencia de *Candida* en esputos y el grado de progreso de las cavidades en los pulmones.
5. Se descubrió cierta evidencia, pero no bastante definitiva, de que *Candida* ocurrió con más frecuencia en los esputos de los pacientes que acababan de entrar en el sanatorio que en los esputos de los que ya habían estado en elpor algun tiempo.
6. Se halló evidencia definitiva de que la incidencia de *Candida* en esputos de tuberculosos no siguió una distribución al azar. Por el contrario, los organismos tendieron a persistir en algunas personas y a estar ausentes consistentemente en otras.

Literature

1. BENHAM, R. W. 1931. Jour. Bact. 49, 183—215.
2. DIDDENS, H. A. und LODDER, J. 1942. Die anaskosporogenen Hefen. Zweite Hälfte. N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, Amsterdam.
3. FISHER, R. A. 1928. Statistical Methods for Research Workers, 2nd Edit., Oliver and Boyd, Edinburgh.
4. MACKINNON, J. E. 1947. Zimología Médica, El Siglo Illustrado. Montevideo.
5. NIEL, C. B. van, and Cohen, A. L. 1942. Jour. Cell. Compar. Physiol 20, 95—112.
6. SCHNOOR, T. G. 1939. Amer. Jour. Trop. Med. 19, 163—169.
7. SKINNER, C. E. 1947. Bact. Reviews, 11, 227—274.
8. SKINNER, C. E., EMMONS, C. W., and TSUCHIYA, H. M. 1947, Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes, 2nd Edit., Wiley and Co., New York.

Estudio comparativo de varias cepas de Paracoccidioides brasiliensis y especies afines

por

RICARDO C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE [1]) y LORENZO MONTEMAYOR [2])

(26. 7. 1948)

La correcta identificación de hongos que poseen caracteres morfológicos pobres unidos a un polimorfismo bastante acentuado plantea problemas que preocupan con frecuencia a los micólogos médicos. Un caso particular de esta clase es la identificación del o de los agentes de la blastomicosis sudamericana llamada también „granuloma paracoccidioidico, enfermedad de LUTZ, SPLENDORE y ALMEIDA etc." ¿Son una o varias las especies productoras de dicha enfermedad?. ¿Como se distinguen de las especies vecinas? Como se comprende en este problema está involucrada la propia definición de la enfermedad e indirectamente la de enfermedades vecinas.

Es con el interés de contribuir en algo a la solución de éstos problemas que nos hemos abocado al estudio de las propiedades biológicas de las cepas que se detallan mas adelante siguiendo en lineas generales las directrices que nos hemos impuesto en el estudio de otros hongos.

Estudiaremos cepas llamadas *Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioides cerebriformis, Glenosporella Loboi* y *Blastomyses dermatitidis.*

Cepas estudiadas

Se efectuó el estudio comparativo de las cepas que a continuación se detallan:

Cepa 630 *Paracoccidioides brasiliensis,* (Splendore) Almeida. Cepa traída de San Pablo por Moore en 1936 con el número 988.

Cepa 777 *Paracoccidioides brasiliensis,* (Splendore) Almeida. Cepa Cancela del primer caso de paracoccidioidomicosis en el Uruguay.

Cepa 792 *Paracoccidioides brasiliensis,* (Splendore) Almeida. Cepa recibida de Arêa Leão con el número 980.

Cepa 724 *Paracoccidioides brasiliensis,* (Splendore) Almeida. Cepa recibida del Paguay.

Cepa 793 Recibida de Arêa Leão con el número 983 y la indicación de „*Blastomycose*".

Cepa 631 *Paracoccidioides cerebriformis,* Moore 1935. Cepa Moore número 1616.

Cepa 717 *Paracoccidioides cerebriformis,* Moore 1935. Cepa recibida de Niño con el número 96.

Cepa 883 *Blastomyces dermatitidis,* Gilchrist Stokes. Cepa recibida de Conant con el número 779.

Cepa 1068 *Blastomyces dermatitidis,* Gilchrist Stokes. Cepa recibida de Emmons con el número 6014.

Cepa 1069 *Blastomyces dermatitidis,* Gilchrist Stokes. Cepa recibida de Emmons con el número 6044.

[1]) Del Instituto de Higiene de Montevideo.

[2]) De la Universidad Central de Caracas.

Cepa 1070 *Blastomyces dermatitidis,* Gilchrist Stokes. Cepa recibida de Emmons con el número 6921.

Cepa 891 *Glenosporella Loboi,* Fonseca y Arêa Leão, 1940. Cepa recibida de Arêa Leão. Colección Instituto O. Cruz número 1488.

Todas estas cepas fueron conservadas en nuestra micoteca por pasajes sucesivos en medio de Sabouraud de conservación e incubadas a la temperatura de 20/25° C.

Técnica y medios de cultivo empleados

En el estudio de las diferentes propiedades biológicas se emplearon los métodos y técnicas descriptos a continuación.

Temperatura de incubación. Todas las experiencias se efectuaron incubando las cepas a una temperatura que variaba entre los 22 y los 26 grados centígrados.

Medios de cultivo. Con el fin de apreciar las características de los cultivos se emplearon medios liquidos y sólidos. Para el estudio en medio líquido se usó el caldo Sabouraud y para el estudio macroscópico de las cepas se emplearon como medios sólidos el agar simple, el agar Sabouraud glucosado al 4% y el medio de Krainsky empleado en el cultivo de actinomyces.

Estudio del aspecto microscópico. Se procedió al estudio de cultivos en lámina efectuados por el método corriente del agar blando con posterior colodionización y tinción por la eritrocina-orange G (eritrocina 0.2 grs, orange G 1 gr., agua destillada 100 cc.) seguida de deshidratación y montaje en bálsamo o por la coloración por el azul cotton al 0.5% en lactofenol y montaje en aceite de cedro y lutaje. Para la observación de las colonias obtenidas en medio líquido se procedió a la tinción por el primer colorante, en un vidrio de reloj, de una colonia con un desarrollo adecuado, ligero lavado posterior con agua destilada y monta en gelatina glicerinada y fenicada.

Dado el caracter peligroso de las especies estudiadas en ambos casos se procedió a la esterilización del cultivo previa a toda manipulación ya sea dejando 24 horas las láminas en una atmósfera de formol o agregando unas gotas del mismo al tubo, ya sea una o otro la técnica seguida para obtener la colonia.

Estudio del aspecto macroscópico. Para ello se observaron colonias cultivadas en medio líquido o en los medio sólidos ya indicados. También se obtuvieron colonias gigantes en agar Sabouraud.

Estudio de las propiedades biológicas. Para el estudio de la utilización de los compuestos nitrogenados e hidrocarbonados se utilizó la técnica auxanográfica empleándose para los primeros un medio base que denominamos A N (auxanograma nitrogeno) y que posee la siguiente composición: fosfato bipotásico 1 gr., sulfato de magnesio 0.5 gr., cloruro de potasio 0.5 gr., sulfato ferroso 0.01 gr., glucosa 30 grs., glicerina 50 grs., agar 20 grs., y agua 1000 cc. A este medio colocado en tubos comunes e inclinado una vez solidificado le agregamos para bañar la superficie XX gotas de una solución de las siguientes fuentes nitrogenadas: peptona (Bactopeptona) al 10%, urea al 2%, asparagina al 2%, nitrato de sodio o potasio al 1% y sulfato de amonio al 2%. Todas estas substancias son esterilizadas por tindalización. Ademas hacemos un tubo testigo al cual no agregamos mas que XX gotas de agua destilada. Dejamos embeber por lo menos 24 horas los tubos y recien entonces los paramos quedando prontos para el uso.

En cuanto para estudiar la asimilación de los azúcares utilizamos un medio base que es similar al de Krainsky, pero sin glucosa, y que denominamos A A K (auxanograma azucares Krainsky) al cual agregamos XX gotas de solución al 20 % de glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y galactosa quimicamente puras y esterilizadas por tindalización. Empleamos la misma técnica que para los compuestos nitrogenados dejando también un tubo testigo con agua.

Estudio de las propiedades proteolíticas. Leche; la empleámos pura y no pasteurizada.

Gelatina; solución al 25% en agua destilada.

Suero de Loeffler; empleamos el corriente utilizado en bacteriología.

Hidrolisis del almidón. Para estudiar la hidrolisis del almidón empleamos tubos

de agar simple al cual hemos incorporado 1 cc de solución al 1 % de almidón soluble por cada 8 cc de medio.

Catalasa. Hacemos actuar sobre los tubos con cultivos agua oxigenada.

Tiempo de lectura. Dada la lentitud de crecimiento de los hongos estudiados fué menester encontrar un tiempo óptimo para efectuar la lectura de las diferentes reacciones o para observer caracteres culturales determinados; obteniendose los siguientes:

para morfología macroscópica de 10 a 12 dias
para morfología microscópica de 25 a 30 dias
para los auxanogramas tanto de los compuestos nitrogenados como de los azucares 30 dias debiéndose prolongar la lectura hasta los 40 dias.
para la acción proteolítica de 30 a 40 dias debiéndose en ciertos casos prolongar por más tiempo la observación.
para la hidrolisis del almidón de 10 a 12 dias.

Anotación de resultados. Utilizamos el sistema de considerar el crecimiento en el tubo testigo con + y en el tubo de máximo desarrollo con +++, empleando ++ para el crecimiento medio. Solo anotamos crecimientos bien nítidos; las pequeñas diferencias no se toman en cuenta.

Modo de efectuar la siembra. La manera de efectuar la siembra es primordial para la obtención de buenos resultados. Esta la efectuamos en el caso de los auxanogramas y cultivos en medios tanto sólidos como líquidos llevando de un tubo de colección que presente un desarrollo abundante y de 10 a 15 dias de incubación un trozo de la colonia que tenga un volumen mas o menos de uno a dos milimetros cúbicos tratando en lo posible de llevar la menor cantidad de agar.

	Auxanograma del nitrógeno						Auxanograma del carbono						Acción proteolítica				
	urea	nitrato de potasio	sulfato de amonio	peptona	asparagina	agua	glucosa	lactosa	sacarosa	maltosa	galactosa	agua	leche	suero Loeffler	gelatina	almidón	catalasa
630	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
777	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
792	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
724	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
793	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
717	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
891	+	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
631	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	+++	+	+	—	+	+	+
883	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	+	++	+	+	—	+	+	+
1068	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	+	++	+	+	—	+	+	+
1069	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	+	++	+	+	—	+	+	+
1070	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	+	++	+	+	—	+	+	+

Resultados

En el cuadro adjunto resumimos el resultado de las propiedades biológicas. A continuación exponemos el conjunto de las observaciones en subcapitulos referentes a *Paracoccidioides brasiliensis, Glenosporella Loboi, Paracoccidioides cerebriformis* y *Blastomyces dermatitidis.*

ESTUDIO DE LAS CEPAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*, (SPLENDORE) ALMEIDA.

Tomamos como cepa tipo para nuestra exposición la cepa número 724 por ser muy vivaz y de características tanto culturales como biológicas muy nítidas.

Aspecto macroscópico

En medio líquido. Crece bien formando colonias de aspecto algodonoso constituida por una corona de hifas formada alrededor del trozo sembrado. Pasado cierto tiempo aparecen pequeñas colonias hijas. La colonia crece en profundidad dejando el líquido claro. Es de color blanco presentando a veces en el centro un punto de color pardo.

En medio sólido. En agar simple crece relativamente bien formando pequeña colonia de color obscuro con solo una corona de micelio que se extiende unos milímetros sobre el medio. Se observa también micelio sumergido. Las colonias son circulares u ovales con el centro levantado, de superficie irregular recubierta de finas barbillas. El borde de la colonia es continuo.

La consistencia de la colonia es dura. Vista por el reverso se observa que el color crema prima en los bordes para hacerse obscuro en el centro de la colonia. No se observa pigmento difusible.

En agar Sabouraud glucosado al 4% crece muy bien, en forma de colonias altas, secas, costrosas de aspecto pulverulento con corona de micelio blanco que se extiende sobre el agar tanto en superficie como en profundidad.

Rodeando la colonia existe una ligera pigmentación parda del agar. El reverso de la colonia que es de color crema se torna pardo en la parte correspondiente al centro.

En medio de Krainsky. El mismo aspecto que en agar Sabouraud glucosado al 4 % pero acentuándose la cantidad de micelio aereo que da a la colonia aspecto velludo y color blanco. El reverso se torna pardo en especial en el centro de la colonia.

Colonia gigante en agar Sabouraud. Colonia blanca circular de bordes continuos presentando una ligera depresión en el centro. La colonia está recubierta de un ligero vello corto que le da un aspecto pulverulento.

Aspectó microscópico. Este se aprecia bien de colonias obtenidas en medio líquido. Se observa gran cantidad de micelio formado por hifas largas, ramificadas que no siguen un orden sino que presentan un aspecto enmarañado.

El extremo libre de la hifa presenta en muchos casos un leve ensanchamiento en forma lanceolada, espatuliforme, piriforme o esférico. Posiblemente este sea el orden de forma que va tomando sucesivamente el extremo de la hifa hasta su estado final o sea el esférico. La esféra puede estar rodeada de una cápsula hialina que en ciertas circunstancias puede envaginar una pequeña parte de la hifa en que se asienta la esfera.

Cuando la formación esférica ha llegado a su máximo desarrollo apárece un tabique en su zona basal.

Observance también elementos desprendidos rodeados de su cápsula.

Estos elementos son considerados como clamidoesporos terminales lo mismo que como intercalares y laterales los que a continuación se detallan.

Los clamidoesporos intercalares son formaciones ovoideas o esféricas que aparecen en el recorrido de la hifa presentando en ocasiones su diámetro principal no paralelo al eje de la hifa.

De estos clamidoeporos hemos observado partir amenudo varias hifas delgadas formando un verdadero nudo. Los clamidoesporos laterales son más pequeños y están unidos a la hifa por uno de sus lados.

Hemos observado cápsula gruesa rodeando los clamidoesporos intercalares y a veces cadenas de ellos alternando con hifas cortas, gruesas, deformes, de bordes sinuosos con netos tabiques de separación y con cierta semejanza a artroesporados.

Al observar entre lámina y laminilla y montada en lactofenol la parte glabra de la colonia hemos constatado entre el conglomerado de hifas la presencia de gran cantidad de elementos redondos, aislados, con gran cápsula que presentaban en ciertos casos elementos mono o polibrotantes. En otros casos un elemento pequeño contenido en el grande y adherido a la pared que presenta en ese punto una saliencia.

Estos elementos se asemejan mucho a los observados en los tejidos vivos y en especial concuerdan con algunas de las imagenes descriptas por BOGLIOLO. (1, 2 y 3)

Las mediciones efectuadas durante la observación microscópica dan las siguientes cifras:

Hifas de 1 a 1.6 micras de ancho
Hifas globulosas ancho máximo 2.4 micras y mínimo 0.8 micras
Clamidoesporos terminales en su mayoría piriformes midiendo sus ejes de 2.4 $\times$ 4 a 6 $\times$ 10 micras.
Clamidoesporos intercalares redondos con un diámetro de 4 a 9 micras; teniendo los ovales 6 $\times$ 10 a 9 $\times$ 15 micras.

Acción proteolítica

En leche la acción proteolítica empieza a evidenciarse a los 30 dias para ser francamente positiva a los 40 dias.

La gelatina es totalmente licuada a los 45 dias.

El suero de Loeffler a los 30 dias no manifiesta haber sufrido acción proteolítica tomando un color obscuro en las vecindades de la colonia.

Utilización de compuestos nitrogenados. Las cepas estudiadas utilizan muy bien la peptona, menos la asparagina y el sulfato de amonio. La urea y el nitrato de sodio o de potasio no son utilizados. En el tubo testigo de agua se observa un crecimiento muy pobre.

Utilización de hidrocarbonados. Es positiva para la glucosa y negativa para la lactosa, sacarosa, maltosa y galactosa. El crecimiento en el tubo testigo de agua es casi nulo.

Hidrolisis del almidón. Positiva.

Catalasa. Positiva.

Las cepas números 630, 777, 792 y 793 pueden ser identificadas a la 724 por sus propiedades bioquímicas.

La cepa 717 que recibimos clasificada como *Paracoccidioides cerebriformis* en la actualidad se parece en su morfología a la *P. brasiliensis* y en cuanto a sus propiedades biológicas tampoco se distinguen de las cepas que nosotros consideramos como *P. brasiliensis.*

ESTUDIO DE LA CEPA NUMERO 891 DE LA ESPECIE LLAMADA *GLENOSPORELLA LOBOI,* FONSECA Y ARÉA LEÃO, 1940

Esta especie descripta y denominada por O. da Fonseca y Arêa Leão (4 y 5) constituye el agente causal de la enfermedad de Jorge Lobo. La descripción micológica dada por estos autores nos hizo pensar que nos

encontrábamos frente a un germen idéntico a *Paracoccidioides brasiliensis.* Esta presunción fué confirmada al estudiar sus propiedades biológicas pués según se puede apreciar en el cuadro de propiedades no se diferencia de las demas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis.*

ESTUDIO DE LA CEPA DE *PARACOCCIDIOIDES CEREBRI FORMIS,* MOORE, 1935

Aspecto macroscópico.

En medio líquido. Sedimento de color blanco de aspecto grumoso que se desmenusa al sacudir el tubo. El líquido sobrenadante es claro. No se observa velo ni película.

En medio sólido. En agar simple las colonias son de color gris claro, mate, de aspecto cerebriforme. En la parte elevada de la colonia el color se hace crema grisaceo. El tamaño de la colonia es pequeño aún a los 30 dias de incubación. Vistas por el reverso las colonias son color ocre.

En agar Sabouraud glucosado al 4%. Colonias blancas, mates, levantadas y de aspecto cerebriforme.

Con el envejecimiento el color blanco de la colonia tórnase crema. Se observa en tubos de cultivos viejos que en la parte más fina del agar (pico de flauta) se desarrollan pequeñas colonias con micelio aereo. El reverso de las colonias es color ocre.

En medio de Krainsky. Aspecto similar al obtenido en agar Sabouraud glucosado al 4% pero obteniéndose colonias de menor tamaño.

Colonia gigante en agar Sabouraud. Colonia blanca ligeramente amarillenta, mate, levantada, glabra, de aspecto cerebriforme (vermiculada). No se observa pigmento difusible.

Aspecto microscópico. De cultivos en medio líquido se obtienen preparaciones que dejan ver una morfología bastante diferente a la de *P. brasiliensis.*

La especie que nos ocupa presenta hifas cortas formadas por segmentos divididos netamente. En ciertos puntos toma el aspecto de un artroesporado. Los elementos que forman una hifa son muy polimórficos y podemos observar los aspectos más variados en una de ellas. A elementos globulosos le siguen otros delgados y largos. Hay hifas cuyas terminaciones presentan un ensanchamiento o clamidoesporo. Estos clamidoesporos lo mismo que algunos intercalares poseen una gruesa membrana que deja ver claramente sus dos paredes.

En algunos de ellos la substancia interior aparece retraída dejando un espacio vacio debajo de la cápsula.

En las preparaciones obtenidas por cultivo en lámina se observa más tendencia a la filamentización.

Las mediciones dan las cifras siguientes:

Hifas de 2 a 7 micras y a veces más, de ancho.

Clamidoesporos tanto terminales como intercalares de 12 a 16 micras de diámetro y en ocaciones más.

Acción proteolítica.

En leche a los 50 días empieza a manifestarse la acción proteolítica manifestándose claramente a los 60 días. Esta acción es más lenta que la observada en *P. brasiliensis.*

En gelatina liquefacción total a los 75 días.

En suero de Loeffler no hemos observado acción alguna.

Utilización de los compuestos nitrogenados. Utiliza muy bien la urea.

el nitrato de potasio o de sodio, la peptona y la asparagina y medianamente el sulfato de amonio. El desarrollo en el tubo de agua testigo es pobre.

Utilización de hidrocarbonados. Esta es positiva para la glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa correspondiendo para la lactosa un crecimiento medio entre las primeras y el tubo testigo.

Hidrolisis del almidon. Positiva.

Catalasa. Positiva.

Temperatura optima de crecimiento. Este hongo crece muy mal en la estufa a 37° C. y en cambio lo hace bien en la de 22° C. Moore fija la temperatura optima en 25° C. (6)

ESTUDIO DE LAS CEPAS DE *BLASTOMYCES DERMATITIDIS*, GILCHRIST Y STOKES, 1896.

Tomamos como tipo la cepa número 883 de nuestra micoteca.

Aspecto macroscópico.

En medio líquido. Colonias blancas ligeramente amarillentas, de desarrollo muy lento, de aspecto membranoso formando el micelio un fieltro compacto. No se forma sedimento ni se observan cambios en el medio.

En medio sólido. En agar simple el hongo desarrolla muy lentamente dando colonias levantadas en el centro y que presentan una superficie irregular de aspecto pulverulento. Los bordes de la colonia son difusos y ligeramente plegados. El anverso de la colonia es color crema y el reverso amarillo ocraceo que se torna pardo hacia el centro de la colonia.

En agar Sabouraud glucosado al 4% la colonia es blanca convexa de superficie algodonosa. A veces las hifas tienen tendencia a agruparse formando barbillas. El color ocre del reverso de la colonia se hace más intenso de la periferia al centro.

En medio de Krainsky se observan colonias de color blanco amarillento, convexas, de superficie irregular con cierto aspecto cerebriforme, mate y pulverulento en ciertas partes. El reverso de la colonias es pardo ocre.

Colonia gigante en agar Sabouraud. Colonia de contorno circular, borde continuo y chato, centro levantado con pliegues que se orientan en disposición radial, superficie lisa, mate, color crema y glabra. No se aprecia pigmento difusible.

Aspecto microscópico. El aspecto de la cepa 883 en medio líquido es el de una colonia filamentosa que presenta sus hifas con un ensanchamiento terminal y con algunos laterales de gran tamaño unidos a la hifa basal por un pequeño pedúnculo. El aspecto de las hifas es más grueso y más burdo que el presentado por las hifas de paracoccidioides en el cual los filamentos son más finos y de curvas más abiertas.

Los elementos esféricos terminales tampoco son iguales aunque presentan bastante similitud con los de paracoccidioides.

Hemos apreciado enormes elementos laterales de forma esférica con una gran vacuola central.

De cultivos en medio sólido en los cuales la colonia no ha desarrollado bastante su micelio aereo o en la parte central interna de las colonias velludas hemos obtenido elementos levaduriformes puros con brotes únicos y a veces hasta con dos sucesivos y en degradación de tamaño.

Estos elementos están rodeados muy amenudo por una muy gruesa cápsula. Se paracen a los observados en los tejidos. (7)

Acción proteolítica.

Leche peptonificación total a los 35 dias.

Gelatina liquefacción parcial a los 35 dias haciendose total a los 50 dias.

Suero de Loeffler a los 30 dias se observa una ligera transparencia del medio en la vecindad de la colonia.

Utilización de los compuestos nitrogenados. Es positivo intenso para la peptona y la asparagina, menor para la urea y el sulfato de amonio y negativo para el nitrato de sodio o de potasio. El crecimiento en el tubo testigo es muy pobre.

Utilización de hidrocarbonados. Es positiva para la glucosa, débil positiva para la galactosa y negativa para la lactosa, sacarosa y maltosa. El desarrollo en el tubo testigo de agua es casi nulo.

Hidrolisis del almidón. Esta reacción es intensamente positiva.

Catalasa. Positiva.

Las cepas número 1068, 1069 y 1070 deben ser consideradas idénticas a la número 883.

ESTUDIO DE LA ACCION PATOGENA EXPERIMENTAL DE *P. BRASILIENSIS* Y *P. CEREBRIFORMIS*

Hemos inoculado cobayos por vía intratesticular con las cepas de *P. brasiliensis* y *P. cerebriformis.* Al sacrificar los animales hemos observado lesiones típicas solamente en los inoculados con *P. brasiliensis.*

Consideraciones

El estudio comparativo de las propiedades biológicas de las cepas estudiadas, resumidas en el cuadro, permiten distinguir tres grupos A, B y C.

A) Un grupo constituido por cepas de *Paracoccidioides brasiliensis,* por *Glenosporella Loboi* y una cepa de *Paracoccidioides cerebriformis* (cepa Niño). En este grupo está incluida una cepa considerada *Paracoccidioides brasiliensis* por Moore y se excluye la especie denominada *Paracoccidioides cerebriformis* por este mismo autor.

Se caracteriza éste grupo principalmente por la similitud existente entre ellas en la utilización de los compuestos nitrogenados e hidrocarbonados. Utilizan muy bien la peptona, menos la asparagina y no utilizan las demas fuentes nitrogenadas. En cuanto a los hidrocarbonados solo la glucosa es utilizada.

Al final de estas consideraciones haremos algunas apreciaciones sobre la urea y el nitrato de sodio.

B) Este grupo estaría constituido por la cepa de Moore *Paracoccidioides cerebriformis* la cual se caracteriza por lo siguiente: tiene una temperatura óptima de crecimiento de 25° C. Además presenta aspecto cerebriforme y no da micelio aereo como las cepas del grupo A salvo en condiciones muy especiales. Es además una cepa muy vivaz y en lo que refiere a los exámenes auxanográficos debemos decir que solo el sulfato de amonio y la lactosa que son utilizados bien, los demas compuestos, tanto nitrogenados como hidrocarbonados, lo son mucho mejor. Como se observa por estos resultados esta cepa se diferencia mucho de las anteriores.

C) Este tercer grupo estaría constituído por las cepas de *Blastomyces dermatitidis* las que poseen auxanogramas que las diferencian perfectamente de los dos grupos anteriores.

Estos resultados tan constantes revelan que el procedimiento de estudio empleado es útil y permite fundamentar sobre bases seguras la distinción de tres especies correspondientes a cada grupo.

Comparadas las propiedades morfológicas de las cepas de cada grupo

no hallamos contraindicaciones de importancia pero deben considerarse; que es el problema de la validez de las especies *G. Loboi* y *P. cerebriformis.*

G. Loboi además de la identidad de sus propiedades biológicas, según nuestras observaciones en los cultivos no es morfologicamente diferente de *P. brasiliensis.* Las esferas, aleuroesporos o clamidoesporos descriptos por O. DA FONSECA y ARÊA LEÃO son idénticas a los observados en *P. brasiliensis.*

En consecuencia no hallamos fundamentos como para distinguir entre si estas dos especies.

En cuanto a *P. cerebriformis* debemos señalar que de nuestras experiencias se desprende que la cepa de Moore es muy diferente a las otras que hemos estudiado y que en cambio la cepa de Niño es igual a *P. brasiliensis.* Es evidente que *P. brasiliensis* puede producir en ciertas circunstancias colonias que se parecen a *P. cerebriformis.* Es evidente por otro lado que solo el estudio de la biología de la cepa de Niño, según los métodos seguidos en este trabajo, permitió establecer la correcta identidad de ésta cepa. En el futuro para identificar una cepa de *P. cerebriformis* será necesario realizar los estudios según las técnicas que enunciamos.

Por inoculación intratesticular al cobayo de las cepas de *P. brasiliensis* y *P. cerebriformis,* comprobamos que la primera se mostró patógena en cambio la segunda no.

Por no disponer de cultivos de *Paracoccidioides tenuis* Moore, 1938 no podemos hacer consideraciones definitivas sobre ésta especie. Aunque debido a las excelentes descripciones y dibujos de MOORE (8) creemos que esta especie podria ser una extraordinariamente vecina a *P. brasiliensis* o quizas una variedad.

En cuanto a las propiedades proteolíticas debemos manifestar: la poseen en grado mínimo *P. brasiliensis, P. cerebriformis* y *B. dermatitidis* debiéndose esperar largo plazo, hasta 60 días, para observarla y solo en leche y gelatina. Estos resultados difieren de los obtenidos por Moore pero creemos que es debido a la diferencia del plazo en que se efectúa la observación.

La toxicidad de ciertas fuentes nitrogenadas empleadas corrientemente en estudios micológicos ya ha sido puesta de manifiesto por algunos autores hace poco tiempo. (9)

Nuestra experiencia en este trabajo nos permitió observar que la urea es utilizable a la vez que es tóxica.

En lo que se relaciona con *P. brasiliensis* podemos decir que el auxanograma de la urea para esta especie es negativa a la concentracíon indicada en la parte de técnica pero que disminuyendo la cantidad de gotas encontramos una concentración de 4 a 6 gotas en la cual la urea es utilizada por *P. brasiliensis* pues se manifiesta un crecimiento claro y que cuando se sobrepasa esa dosis el crecimiento disminuye hasta hacerse nulo. En lo que se refiere a *B. dermatitidis* vemos que el crecimiento es mayor a medida que disminuye la concentración. La concentración máxima experimentada fué de X gotas. Para esta especie y hasta ésta concentración no se observa acción tóxica de la urea.

El nitrato de sodio no es utilizado por las especies nombradas pues el crecimiento es nulo aún empleando cantidades mínimas.

Concluciones

1) El estudio de la capacidad de utilizar diversos compuestos nitrogenados e hidrocarbonados, según las técnicas descriptas en éste trabajo revela

la constancia y nitidez de los resultados y ser por lo tanto un procedimiento útil para distinguir entre sí las especies *P. brasiliensis, P. cerebriformis*, y *B. dermatitidis.*

2) *Glenosporella Loboi* agente de la enfermedad de LOBO no se distingue de *Paracoccidioides brasiliensis.*
3) *Paracoccidioides cerebriformis* es una especie muy diferente de *Paracoccidioides brasiliensis.*
4) *Paracoccidioides cerebriformis* (cepa MOORE) no se mostró patógeno para el cobayo por inoculación intratesticular en cambio *Paracoccidioides brasiliensis* produjo las típicas lesiones conocidas.
5) Las colonias de *Paracoccidioides brasiliensis* pueden adoptar aspectos parecidos a los de *Paracoccidioides cerebriformis.*
6) Cuatro cepas de *Blastomyces dermatitidis* muestran identicas propiedades lo cual es indice de la individualidad nosológica de la enfermedad de GILCHRIST.

Summary and conclusions

A comparative research of the biological characteristics of the studied strains allowed us to distinguish three groups A, B and C.

Group A. This group is formed by the strains named *Paracoccidioides brasiliensis,* the strain named *Glenosporella Loboi* and a strain named *Paracoccidioides cerebriformis* by Niño.

The main characteristics of the group are found in the study of the utilization of different sugars and nitrogenous compounds. A good growth is observed with peptone and not so good with asparagine. The other nitrogenous compounds had no effect on the growth of the strains studied. Nevertheless a little influence was observed with low quantities of urea. Among the assayed sugars only glucose was utilized.

These strains are pathogenic for the guinea pig.

Group B. Moore's strain named *Paracoccidioides cerebriformis* is the only strain of the group. It has a low optimal temperature (25° C.). The cultures show a cerebriform aspect although scarce aerial mycelium may be produced in rather conditions. Moreover, it is a luxuriant strain which utilizes all the nitrogenous compounds as well as all the sugars assayed. Consequently the original strain named *Paracoccidioides cerebriformis* by Moore is quite different from *Paracoccidioides brasiliensis.* Moore strain of *Paracoccidioides cerebriformis* was inoculated to guinea pigs (in the testicles) and it was non pathogenic.

Group C. This group is formed by four strains *Blastomyces dermatitidis.* All strains are identical. A good growth is observed with peptone and asparagine and not so good with urea, and ammonium sulphate. The potassium nitrate had no effect on the growth of the strains studied. Among the assayed sugar only in glucose is observed a good growth, and not so good in galactose.

Some strains of *P. brasiliensis* show cerebriform growths on artificial culture media but they are biologicaly identical. Nevertheless the original strain of *P. cerebriformis Moore* is quite different from *P. brasiliensis.*

P. brasiliensis is pathogenic for guinea pigs, while *P. cerebriformis* is non-pathogenic. As only one strain (Moore's strain) has been found, we think that.

Glenosporella Loboi described as the agent of a special disease (Lobo's disease) is not different from *P. brasiliensis.* Moreover the aleuriospores described by Fonseca and Arêa Leão are not different those observed in *P. brasiliensis.*

We could not study *Paracoccidioides tenuis* but the excellents descriptions and figures of Moore allow us to think that this species is so close to *P. brasiliensis* that it is difficult to admit it as a different species. It may be a variety.

CONCLUSIONS. The study of the utilization of nitrogenous compound and sugars by strains named *Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioides cerebriformis, Glenosporella Loboi* and *Blastomyces dermatitidis* allow us to obtain clear and constant results and to find the followings conclusions:

a) Moore's strain named *P. cerebriformis* is quite different from *P. brasiliensis.*

b) *P. brasiliensis* may produce cerebriform cultures but its biological properties allowed us to distinguish this species from *P. cerebriformis.*
c) *P. brasiliensis* is pathogenic for guinea pigs while *P. cerebriformis* is non-pathogenic.
d) *Glenosporella Loboi* cannot be distinguished from *P. brasiliensis* and consequently Lobo's disease is a form of the South American blastomycosis.
e) Four strains of *Blastomyces dermatitidis* showed similar properties different from *P. brasiliensis.* Consequently Gilchrist's disease is a very well definite disease.

Agradecimiento

Por intermedio de estas lineas queremos hacer llegar al Prof. Dr. Juan E. Mackinnon nuestro profundo agradecimiento por las indicaciones prestadas durante el desarrollo del presente trabajo.

Referencias

1 BOBLIOLO, LUIGI. Contribuição ao conhecimento da morfologia do agente da molestia de Lutz em seu ciclo parasitario. Rev. Brasil. Biol., *5* (3):321—338, 1945.
2 BOGLIOLO, LUIGI. Contribuição ao conhecimento da morfologia do agente causal da molestia de Lutz. Rev. Brasil Biol., *6* (1):61—71, 1946.
3 BOGLIOLO, LUIGI. Terceira contribuição ao conhecimento da morfologia do agente causal da molestia de Lutz nos tecidos humanos parasitados *6* (2):181—197, 1946.
4 FONSECA, O. DA. ARÊA LEÃO, A. E. Contribuição para o conhecimento das granulomatoses blastomicoides. O agente etiologico da doença de Jorge Lobo. Rev. Medico-Cirurgica do Brasil *3*: 147—158, 4 est., 1940.
5 FONSECA, O. DA. Parasitologia Medica. Editora Guanabara, Rio de Janeiro 1943 Tomo 1, pag. 703—710.
6 MOORE, MORRIS. Un nuevo tipo clínico de blastomicosis producido por *Paracoccicioides cerebriformis* n.s. Arch. Urug. Med. Cir. y Especialidades *8* (3); 224—225, 1936.
7 CONANT, N. F., MARTIN, D. S., SMITH, D. T., BAKER, R. D. & CALLAWAY, J. L. Manual of Clinical Mycology. W. B. Saunders Company. Philadelphia and London, 1944.
8 MOORE, MORRIS. Blastomycosis, coccidioidal granuloma and paracoccidioidal granuloma. Arch. Derm. and Syph. *38*; 163—190, 1938.
9 WICKERHAM, L. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. Jour. of Bact. *52* (3): 293—301, 1946.

Lamina No 1

Fig. 1 *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa 724 auxanograma de compuestos nitrogenados.
Fig. 2 *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa 724 auxanograma de azúcares.
Fig. 3 *Blastomyces dermatitidis*, cepa 833 auxanograma de compuestos nitrogenados.
Fig. 4 *Blastomyces dermatitidis*, cepa 833 auxanogramas de azúcares.
Fig. 5 *Paracoccidioides cerebriformis*, cepa 631 auxanograma de azúcares.
Fig. 6 *Blastomyces dermatitidis*, cepa 833 (de izquierda a derecha) cultivo en medio Krainsky, agar simple y caldo Sabouraud.

Lamina No 2

Fig. 1 Forma levaduriforme de *Blastomyces dermatitidis.*
Fig. 2 Cultivo en medio líquido de *P. brasiliensis* (cepa 724) mostrando clamidoesporo terminal con su cápsula X 800 d.
Fig. 3 Colonia gigante de 15 dias de *Blastomyces dermatitidis* (cepa 883).
Fig. 4 Colonia gigante de 15 dias de *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa 724).
Fig. 5 Colonia gigante de 15 dias de *Paracoccidioides cerebriformis* (cepa 631).
Las fotografías fueron ejecutadas en el Servicio Fototécnico del Instituto de Higiene bajo la dirección del Sr. M. Santa Rosa.

The Dependence on the Weather of the Incidency of Sporotrichosis

by

Juan E. MACKINNON
(*From the Instituto de Higiene Experimental. Montevideo-Uruguay*)
(4. 9. 1948)

Sporotrichosis is not a rare disease in Uruguay. We have diagnosed 46 cases between 1929 and 1948. After a few years we could appreciate that in some years several cases came to consultation while no case was

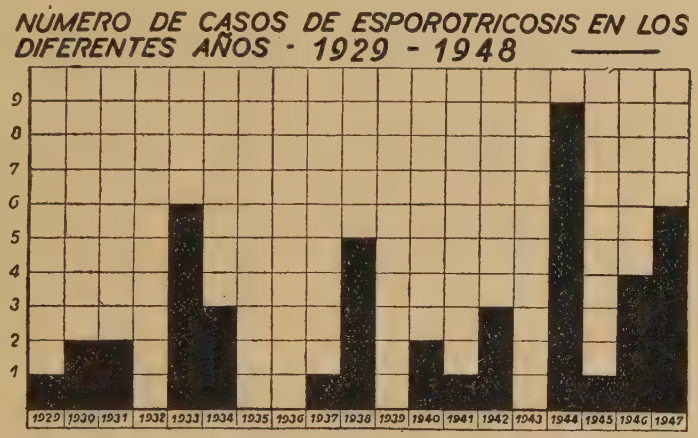


Fig. 1. Annual incidency of sporotrichosis in Uruguay (1929—1948).

observed in other years. (fig. 1). We also could appreciate that when one case of sporotrichosis was diagnosed other cases were also observed by us or by our colleagues. We thought that these facts were not due to simple coincidences but to some cause as the weather conditions during some periods which could favourish the growth of the sporotrichum in its natural place of growth. To confirm our hypothesis we have determined, as accurately as possible, the dates of contamination of our patients and the more outstanding weather conditions during the periods around these dates. This research was possible because usually our patients contracted the infection through wounds which were well remembered. The patients arrived to the laboratory usually a few months after the contamination.

We could ascertain the month of the contamination in 32 patients. Most of them could also determine the week and some even the day. In the figure 2 we show the incidency of the sporotrichosic contamination during

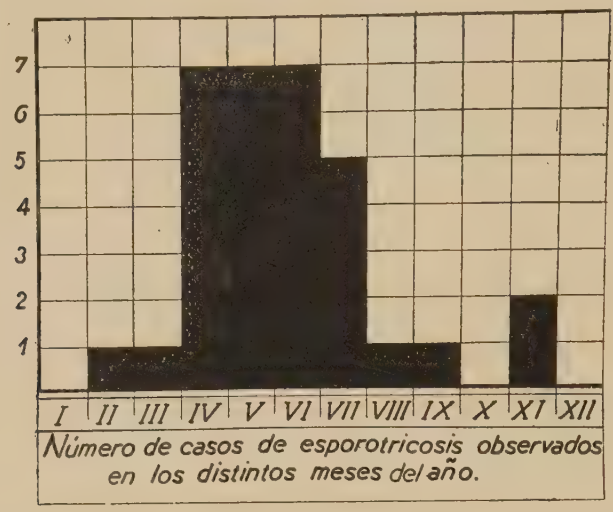


Fig. 2. Monthly incidency of sporotrichosis in Uruguay (1929—1948).

every month of the year. During April, May, June and July (our Autumn and first half of our Winter) 26 cases were recorded while only 6 patients contracted the infection during the other 2/3 of the year.

During the year 1938, five cases of sporotrichosis were recorded. All the five patients contracted the disease during the Autumn and three of them during April.

In 1944, nine cases were registered. All the patients contracted the infection between May 21 and June 7 (fig. 6). This is the most striking feature in our research because it shows that in Uruguay sporotrichosis is contracted during a few days of the year.

In 1946, four patients were observed. Two contracted the disease at the beginning of June, one at the beginning of July and the other at the end of August.

In 1947 we were able to observe a feature similar to that of 1944. Six cases were diagnosed and three of them remembered the day of the contamination: one patient the 3rd of April and two patients the 4th of April. Another patient remembered that he contracted the infection between the 2nd and the 5th of April. Another patient during the first week of April. The sixth patient during February. The first days of April 1947 coincided with the Holy Week and that was the cause why our patients remembered so well the dates of the contaminations (fig. 7).

Weather conditions during the periods of sporotrichosic contamination. We tried to discover some relationship between the monthly frequency of the sporotrichosis and the normal mean values of the relative humidity (fig. 3). We may appreciate that the relative humidity shows increasing values when the probabilities of sporotrichosic contaminations are also increasing. The disease is frequent during April and May, just when the rainfalls are also abundant (fig. 5). The relationship with the temperature (fig. 4) is not very clear but when the mean values are between 16 and 19° C the frequency of the sporotrichosis is increasing; nevertheless, sporo-

trichosis is not frequent during our Spring with the same values of temperature as in Autumn.

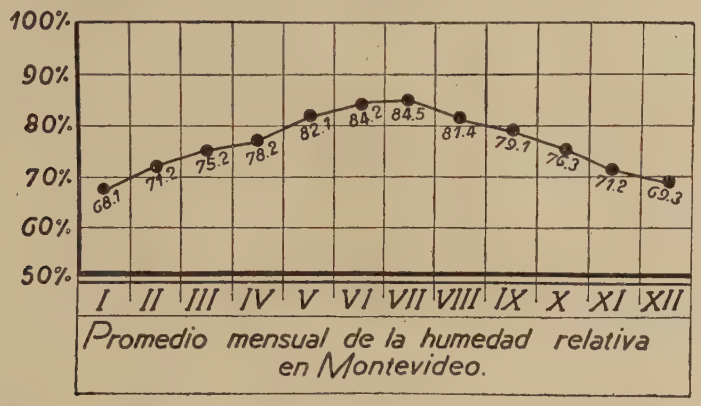


Fig. 3. Relative humidity in Uruguay. Mean values during 56 years according to Morandi (Monthly values).

Later on, we studied the weather conditions during the short periods of 1944 and 1947, when many patients contracted the disease. During the last third of May 1944, very high values of the relative humidity were registered (mean values near saturation), the temperature oscillated between 16 and 20° C and the rainfalls were frequent; at the beginning of June 1944 cool winds produced abundant rainfalls. During the first week of April 1947 the relative humidity oscillated around 80% (mean values) and the mean values of the temperature between 17 and 19° C; moreover, rainfalls were registered almost every day. We wish also to remark that during April 1938 the rainfalls totalized the big cipher of 226 mm.

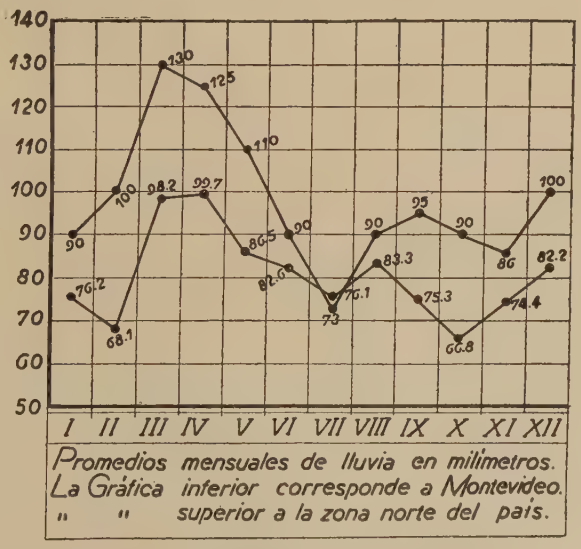


Fig. 4. Rainfall in millimeters in Uruguay. The lower graph show the monthly mean values during 54 years in the southern part of Uruguay according to Morandi (1883—1936). The upper graph has been done with the mean values during 40 years in the north of Uruguay according to Bergeiro (1906—1947).

Comments

Our observations allow us to appreciate that in Uruguay, at least an important percentage of the sporotrichosic patients contracted the infection during Autumn and the beginning of Winter (26 cases over 32) and during very short periods of time (a few days sometimes). We could also appreciate that very special weather conditions prevailed during these periods. These conditions were: 1) High values of the relative humidity (80% to saturation). 2) Mean values of the temperature between 16 and 20° C and no low values during the night. 3) Abundant and repeated rainfalls. These conditions prevailed for some days, perhaps more than a week.

We think that sporotrichosis is more frequent during our Autumn and first half of the Winter because during this period of the year, the weather conditions, necessary for the growth of *Sporotrichum Schenckii* are more frequently obeyed.

Some cases occur which have no explanations from the weather conditions but they seem to be very scarce.

Our observations during 1944 enabled us to forecast the small epidemic outbreak of April 1947.

Our results may be compared with those of the South-African authors in the gold mines. PIPJER and PULLINGER (6) failed to diagnose sporotrichosis on the surface in South-Africa but discovered an outbreak comprising 14 cases underground in a gold mine. DANGERFIELD and GEAR in 1941 studied a new outbreak. DU TOIT (9) observed 650 cases at the Venterpost mine in the Transvaal and all the patients "with the exception of one or two contracted the disease underground". DU TOIT emphazises that: "Two factors which may be partly responsible for the excessive prevalence and spread in the Venterpost mine as compared with the other mines may be the fact that Venterpost is cooler than any of the other affected mines and extremely wet".

More recent researchs on the sporotrichosis infection have been published in a *Symposium* of the Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officer's Association. BROWN, WEINTROUB and SIMPSON (3) were able to isolate the fungus many times from sound, untreated timber. SIMSON, HELM and BOWEN (7) carried out with these cultures pathogenicity tests on human volonteers. BOWEN, WEINTROUB and SIMPSON cultivated the fungus on wood, specially on *Eucalyptus saligna* and *Acacia mollissima* and studied the influence of the relative humidity on the germination and growth of the so-called *Sporotrichum Beurmanni,* and the results indicate that when well seasoned timbers are used the growth of the fungus is not sustained unless the relative humidity is between 95 and 100%. The temperature prevailing in the places where the fungus was growing ranged from 28 to 29° C (79 to 82.5° F.) HELM and BERMAN (4) remark that the maximum incidence at Venterpost occurred during January, and March which are months of the greatest heat and humidity. From April onwards the weather becomes cool and dry. Nevertheless it is emphazised that there is little or no fluctuation in underground conditions of heat and moisture whatever weather conditions prevail on the surface. While sporotrichosis is a very rare disease on the surface in South-Africa, in Uruguay small outbreaks are not rare during small periods of a few days when the weather conditions (moisture and heat) are particularly favorable for the growth of *Sporotrichum Schenckii.* These conditions are more frequently obeyed during the Uruguayan Autumn. Of course, weather conditions are very variable during

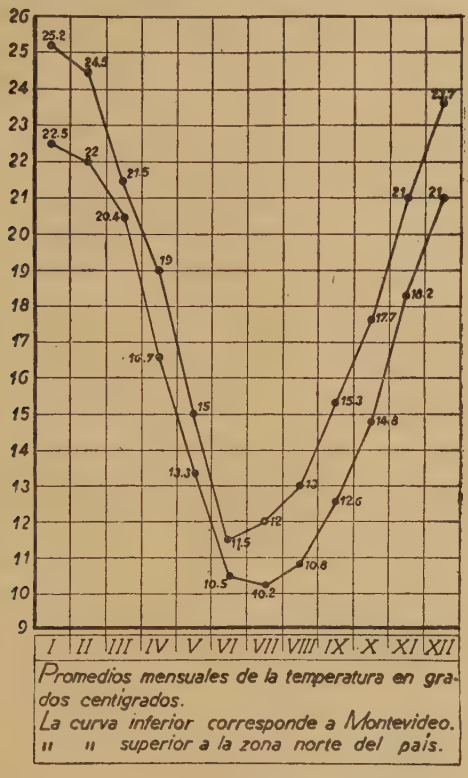


Fig. 5. Temperature. The lower graph has been written with the montly mean values during 54 years in the southern part of Uruguay (Montevideo) according to Morandi (1883—1936). The upper graph shows the mean values in the north of Uruguay according to Bergeiro during 40 years (1906—1947).

the day on the surface, and the mean values of the relative humidity and temperature are not so rigid and constant as it occurs underground in a mine.

Mean temperature during the periods with sporotrichosis ranged between 16 and 20° C. Higher temperatures, until 30° C, seems to be benefical for *S. Schenckii* growing on artificial media. We think that the sporotrichosis is rare in Uruguay during the Summer, because high values of the relative humidity are rarely reached and do not persist for a sufficient number of days. During our Uruguayan Winter low temperatures are not suitable for a good growth of the sporotrichum; nevertheless, during some abnormal periods with warm winds from the north the weather conditions may become suitable.

The geographical distribution of sporotrichosis may be explained by the weather conditions. Sporotrichosis is a very rare disease in semiarid areas. In the United States it is a common disease in the north-central part and not frequent in California and dry zones. Just the contrary occurs with the coccidioidomycosis. A recent paper by SMITH, BEARD, ROSENBERGER and WHITING (8) demonstrates that the monthly incidency of coccidioidal infection increases in California during the dry months of June, July, August and September and diminishes when the rainfalls begin.

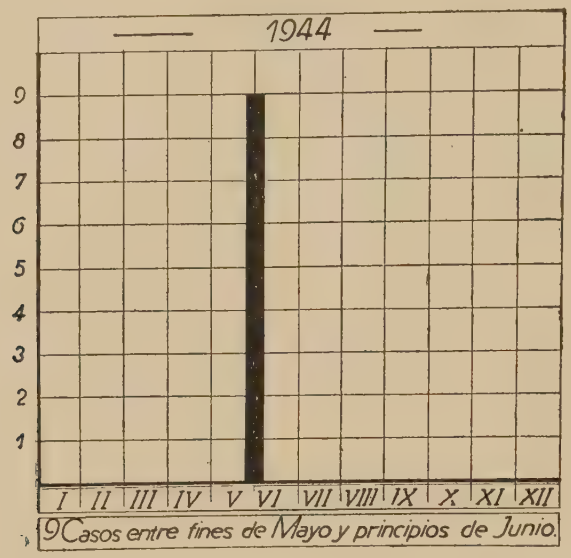


Fig. 6. Short period with sporotrichosis during 1944. Nine cases at the end of May and beginning of June. No other case during the other periods of 1944.

The epidemiology of the sporotrichosis shows some peculiarities of the epidemiology of the ankylostomiasis although the sporotrichum does not need so high temperatures as the larvae of the hook worms and although it is an aberrant or facultative parasite which does not deed human or animal hosts.

Many examples similar to that of the sporotrichosis may be found in the study of the outbreak of some diseases of plants. Potato blight epidemics appear when special conditions of moisture and temperature are obeyed. The Dutch rules of Van Everdingen or the more simple rule of the

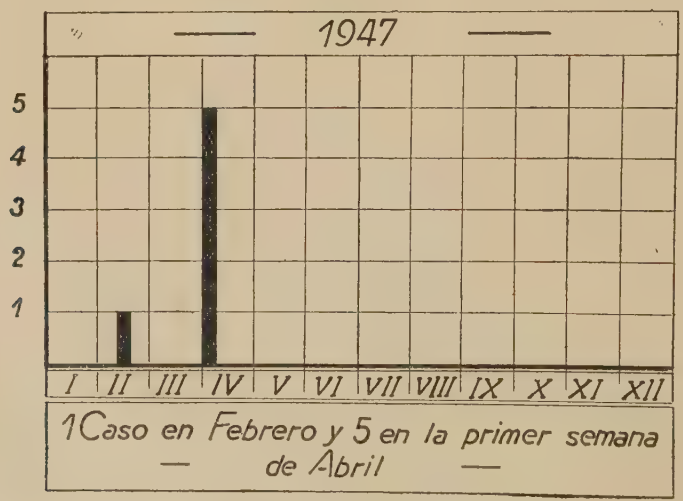


Fig. 7. Sporotrichosis during 1947 in Uruguay. Five cases during the first week of April. One case during February.

temperature-humidity have been recently discussed by BEAUMONT (1). The potato blight would appear when the minimal temperature is above 10° C and the relative humidity over 75% during two days at least.

Conclusions

1. From 32 cases of sporotrichosis observed in Uruguay between 1929 and 1948, 26 cases contracted the disease during April, May, June and July (Autumn and first half of the Winter) and only six cases during the other 2/3 of the year.
2. Nine patients contracted the infection during 17 days of 1944 (May 21—June 7) and no any other case was contaminated out of this period of 1944.
3. From six cases observed in 1947, five patients contracted the disease during the first week of April.
4. Weather conditions during the named periods of 1944 and 1947 were: A) High values of the relative humidity (almost to saturation during the period of 1944 and 80% during the period of 1947. B) Temperature between 16 and 20° C (mean values) during the last third of May 1944. Temperature between 17 and 19° C during the first week of April 1947. C) Repeated rainfalls were registered during both periods.
5. It is our opinion that weather conditions have a great influence on the incidency of sporotrichosis. The infection is contracted more frequently during April, May, June and July because during these months of the year the weather conditions necessary for the growth of *Sporotrichum Schenckii* are more frequently obeyed in Uruguay.
6. Our own observations on the surface in Uruguay, are compared with those of the South-African investigators underground, in the gold mines of the Witwatersrand. The same factors are the causes: high values of the relative humidity (98 to 100%), a suitable temperature, and moist surfaces.
7. The geographical distribution or the geographical incidency of the sporotrichosis seem to obey to the climatological conditions.

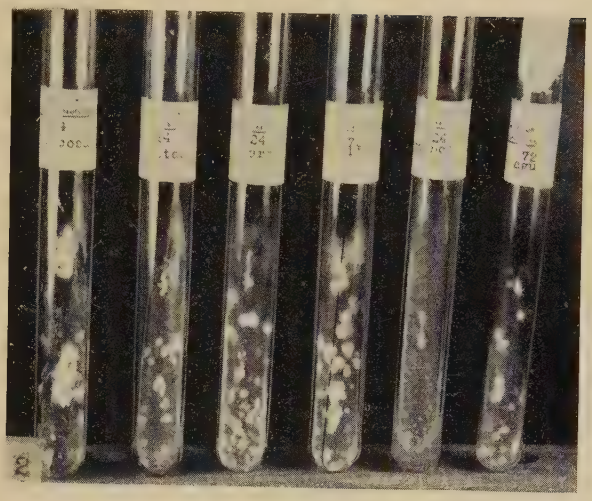
List of references

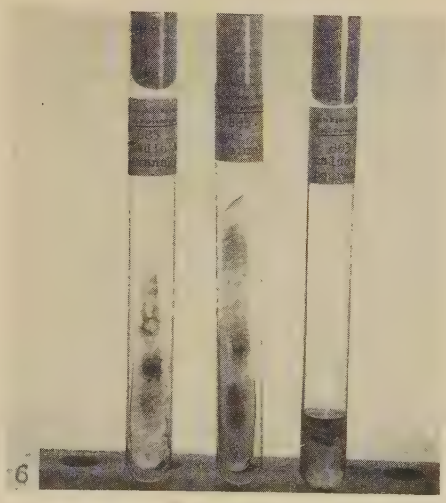
1. BEAUMONT, A. The dependence on the weather of the dates of outbreak of potato blight epidemics. The British Mycological Society's Transactions, *31*: 45—53, 1947.
2. BERGEIRO, J. M. Calendario climatológico para todo el Uruguay. Imprenta Urta y Curbelo. Montevideo, 1947.
3. BROWN, R., WEINTROUB, D. and SIMPSON, M. W. Timber as a source of sporotrichosis infection. In: Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Symposium of the Proc. of the Transvaal Mine Medical Officer's Ass.; 5—33, 1947.
4. HELM, M. A. F., and BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. In: Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand: Symposium of the Proc. of the Transvaal Mine Medical Officer's Ass.: 59—72, 1947.
5. MORANDI, L. Ocho años (1929—1936) de observaciones meteorológicas en la Estación de Aeronáutica Militar. Montevideo, 1938.
6. PIPJER, A. and PULLINGER, B. D. An outbreak of sporotrichosis among South-African native miners. The Lancet, 1927, page 914.
7. SIMSON, F. W., HELM, M. A. F. and BOWEN, J. W. The pathology of sporotrichosis in man and experimental animals. In Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Symposium of the Proc. of the Transvaal Mine Medical Officer's Ass. 34—58, 1947.

8. SMITH, CH. E., BEARD, R. R., ROSENBERGER, H. C. and WHITING, E. G. Effect of Season and dust control on occidioidomicosis. Jour. Am. Med. Ass., *132*: 833—838, 1946.
9. TOIT, C. J. DU. Sporotrichosis on the Witwatersrand. Proc. of the Transvaal Mine Medical Officer's Ass., *22*: 111—127, 1942.

Acknowledgment

The author is deeply indebted to J. M. Bergeiro for his assistance to determine weather conditions during the periode with sporotrichosis.





1
2
3
883
4
724
5
631

Estudio de algunas propiedades biológicas de varias cepas de Coccidioides immitis Stiles, 1896

por

Ricardo C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE

(*del Instituto de Higiene de Montevideo, Uruguay*)

(4. 9. 1948)

La coccidioidomicosis representa para los Estados Unidos un problema higienico pues ademas de los casos evolutivos se han encontrado gran cantidad de cuadros benignos. Por otra parte se ha podido establecer que un gran porcentaje de habitantes de zonas con veranos secos y prolongados presentan una reacción positiva a la coccidioidina.

La influencia de la humedad es completamente cierta pues con la iniciación de la lluvias el número de contaminaciones disminuye verticalmente (1).

En America del Sur el problema es mucho menor pues los casos registrados son pocos. En Europa y Australia han sido descriptos una cantidad mínima de casos.

En lo que se refiere al hongo podemos decir que no manifiesta caracteristicas muy marcadas en los cultivos presentando caracteres parecidos a los agentes de la histoplamosis y blastomicosis conservados largo tiempo en la micoteca.

Es por lo tanto que como contribución para aclarar estos problemas de diagnosis que hemos realizado el estudio de algunas propiedades biológicas ademas de las morfológicas de varias cepas de *Coccidioides immitis* conservadas desde hace años en la micoteca del Laboratorio de Micologia de este Instituto.

Cepas estudiadas

Cepa No. 625 Recibida del Laboratorio de Parasitologia de Paris con el número 821.

Cepa No. 684 *Coccidioides immitis* Stiles in Rixford et Gilchrist, 1896 recibida en 1937 de Almeida quien la recibio a su vez de D. Spring en 1930 con el número 1091. En la micoteca de Almeida posee el número 249. Esta especie fue determinada por Fred. Weidmann.

Cepa No. 826 Cepa aislada por Veintemillas en 1941 en La Paz, Bolivia y enviada con pieza histológica como „fragmento de lengua de hombre que vivio en el Chaco y que presentaba cuadro ganglionar". Fue determinada por Mackinnon como *Coccidioides immitis*.

Cepa No. 850 Cepa recibida de Negroni con la denominación de *Trichosporon proteolyticum* Negroni y Villafañe-Lastra, 1939.

Todas estas cepas han sido conservadas en nuestra micoteca por pasajes sucesivos en agar Sabouraud e incuvados a 22° C.

Técnica y métodos empleados

El estudio de este grupo de hongos lo hemos efectuado observando su aspecto en los cultivos y algunas de sus propiedades biológicas como ser la utilización de compuestos nitrogenados e hidrocarbonados.

Para la observación de los caracteres macroscópicos efectuamos siembras en agar Sabouraud glucosado, en caldo Sabouraud, en medio de Krainsky y en agar simple. Para los microscopicos se efectuaron cultivos en lámina y se observaron colonias de medios líquidos.

Para el estudio de la acción proteolitica se sembraron los hongos en leche, suero de Loeffler y gelatina al 25% en agua destilada.

Tambien se estudió su acción sobre el almidón y la catalasa por los medios corrientes.

Para el estudio de la utilización de los compuestos nitrogenados e hidrocarbonados seguimos en general las técnicas corrientes en nuestro laboratorio y en particular las que empleamos en el estudio de varias cepas de *Paracoccidioides* (2).

Resultados

Aspecto macroscópico.

En medio liquido de Sabouraud. En el fondo del tubo se observa un desarrollo mas bien escaso en forma de copos blancos de aspecto algodonoso. En la superficie del líquido se observa una película que al sacudir cae al fondo. En ciertas ocaciones puede no formarse la película.

En medio sólido. En agar Sabouraud glucosado al 4% cultiva facilmente observandose claramente desarrollo de la colonia a los 4 o 5 dias. Se forma una corona miceliana de color blanco de aspecto algodonoso. La colonia es bastante adherente al medio. Con la edad la colonia toma un color levemente gris presentando el reverso de un color blanco amarillento. Se observa micelio sumergido.

Las colonia gigantes en el mismo medio tienen igual aspecto que en los tubos. La colonia llega a su máximo desarrollo a los 30/40 dias teniendo un diametro de 5 a 6 centímetros.

En agar simple a los 10 dias las colonias son altas, blancas, velludas presentando el reverso color blanco. El aspecto es similar al observado en agar Sabouraud pero siendo menor la intensidad del desarrollo.

En medio de Krainsky. El aspecto es igual al del medio anterior pero disminuyendo todavia mas la intensidad del desarrollo. Solo se obtienen colonias pequeñas.

Aspecto microscópico.

En cultivo en lámina, como en colonia de medio líquido y coloreada por azul cotton no observamos en nuestras cepas caracteristicas de crecimiento suficientes como para una correcta identificación. Se observa solamente una madeja de finos filamentos ramificados.

Temperatura óptima de crecimiento. No hemos encontrado mayor diferencia de desarrollo entre los cultivos obtenidos a 22° C. y los a 37° C. Ciferri y Redaelli fijan la temperatura óptima entre los 25 y 30° C. pudiendose desarrollar bien a 37° C. (3) — citado por Niño. —

	Urea	Nitrato de potasio	Sulfato de amonio	Peptona	Asparagina	Testigo	Tiempo de lectura	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Galactosa	Testigo	Tiempo de lectura	Leche	Suero Loeffler	Gelatina	Tiempo de lectura	Almidón
625	+++	+	++	+++	+++	+	20 dias	+++	+	+	+	+	+	10 dias	+	—	+	10/20 dias	—
684	+++	+	++	+++	+++	+	20 dias	+++	+	+	+	+	+	10 dias	+	—	+	10/20 dias	—
826	+++	+	++	+++	+++	+	20 dias	+++	+	+	+	+	+	10 dias	+	—	+	10/20 dias	—
850	+++	+	++	+++	+++	+	20 dias	+++	+	+	+	+	+	10 dias	+	—	+	10/20 dias	—

Tension de oxigeno. Aerobio pero crece lentamente en semianaerobiosis en no lo hace cuando es estricta (3).

Acción proteolítica.

En leche, la peptonificación total se observa a los 20 dias.

En gelatina, la liquefacción total se observa a los 20 dias y a cero grado centígrado.

En suero de Loeffler a los 10 dias hemos observado el desarrollo de una gran colonia sin acción aparente sobre en medio en ese lapso.

Hidrolisis del almidón. A los pocos dias se manifiesta francamente positiva.

Catalasa. Positiva.

Utilización de compuestos nitrogenados e hidrocarbonados.

Como se observa en el cuadro adjunto vemos que las cepas estudiadas de *Coccidioides immitis* se comportan fronte a los compuestos nitrogenados estudiados del modo siguiente: positivo intenso para la urea, peptona y asparagina, positivo debil para el sulfato de amonio y negativo para el nitrato de potasio. El crecimiento en el tubo testigo es muy pobre similar al observando en el nitrato de potasio. El tiempo óptimo para efectuar la lectura es de 20 dias.

En cuanto a los hidrocarbonados empleados vemos que solo utiliza la glucosa no utilizando la lactosa, sacarosa, maltosa y galactosa.

El crecimiento en el tubo testigo es casi nulo. El tiempo óptimo para efectuar la lectura es de 10 dias.

Consideraciones y conclusiones

Del estudio efectuado se desprende la constancia de los resultados obtenidos lo que permite apreciar claramente algunas propiedades de la especie *Coccidioides immitis* y en lo relativo al empleo de fuentes de nitrógeno y carbono que se caracteriza por la utilización intensa de la urea, peptona y asparagina, menor del sulfato de amonio y la no utilización del nitrato de potasio. De los hidrocarbonados solo utiliza la glucosa.

La acción proteolítica se observa solo en leche y gelatina y no en suero de Loeffler dentro del plazo de dias indicado.

De las cepas estudiadas la número 850 merece un estudio detenido pues constituye la especie *Trichosporon proteolyticum* Negroni y Villafañe-Lastra, 1939 (4).

Esta especie fué recibida en nuestro laboratorio proveniente de los autores y fué estudiada por MACKINNON (5) quien observó que los cultivos presentaban los caracteres y propiedades bioquímicas de *C. immitis*. Ademas inoculado a cobayos machos por via intraperitoneal estos presentaban a los 50 dias intensa orquitis y abscesos peritoneales y epiploicos con las típicas esferas endosporadas de *C. immitis*.

Uno de los autores creadores de la especie en un trabajo posterior (6) manifiesta que *T. proteolyticum* por sus caracteristicas es igual a *Pseudococcidioides Mazzai* germen este observado en un caso de afección laringea pero del cual no se pudo obtener cultivo por haber sido diagnosticado en material fijado. F. DE ALMEIDA considera P. MAZZAI como sinónino de *C. immitis*, opinión que compartimos.

NEGRONI y RADICE efectuaron el estudio de *T. proteolyticum* empleando técnicas especiales pero no estudian con las mismas técnicas ninguna cepa clasificada como *C. immitis*. Ellos anuncian tales estudios cuyos resultados nos son necesarios para valorar sus concluciones.

Nosotros en varios estudios practicados en diversas épocas no hemos encontrado diferencias entre *Coccidioides immitis* y *Trichosporon proteolyticum*. Por lo tanto consideramos la segunda especies como sinónima de la primera.

Summary

The assimilation of sugars and nitrogenous compound by the species *Coccidioides immitis* has been studied and also some others biological propierties: proteolytic and amilolytic activity.

Three strains named *Coccidioides immitis* (one of then isolated in Bolivia by Dr. Veintemillas) and the strain named *Trichosporon proteolyticum* were studied. The four cultures showed the same properties. Urea, asparagine and peptone are well utilized, ammonium sulphate is also utilized but potassium nitrate is not assimilated. Glucose is utilized but maltose, sucrose, galactose and lactose are not assimilated. All the strains showed proteolytic activity on the milk and gelatine but the proteolysis of the cogulated serum was not evident.

Referencias

1 SMITH, CH. E., BEARD, R. R., ROSENBERGER, H. G. and WHITING, E. G. Effect of season and dust control en coccidioidomycosis. Jour. Am. Med. Ass. *132*: 833—838, 1946.

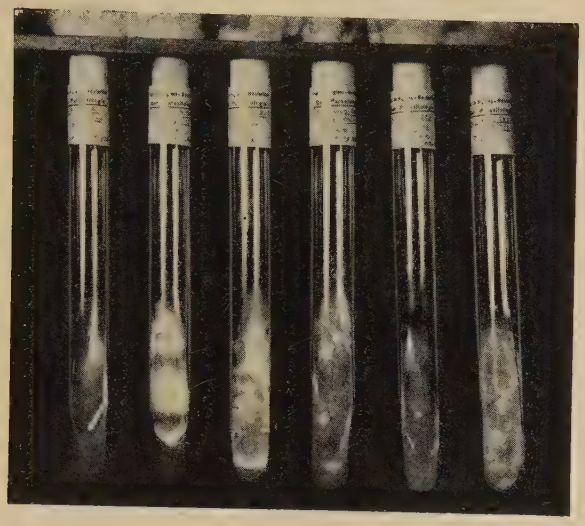
2 ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. y MONTEMAYOR, L. Estudio comparativo de varias cepas de *Peracoccidioides brasiliensis* y especies vecinas. Mycopathologia, 1949 (en este mismo numero.)

3 NIÑO, F. Las blastomicosis en la Argentina. Bol. Inst. Clin. Quir. *117*, 1938 Ed, El Ateneo Buenos Aires.

4 NEGRONI, P. y VILLAFAÑE-LASTRA, T. Micosis generalizada y mortal por *Trichosporon proteolyticum* n.sp. Mycopathologia Vol. 2 (1): 52—59, 1939.

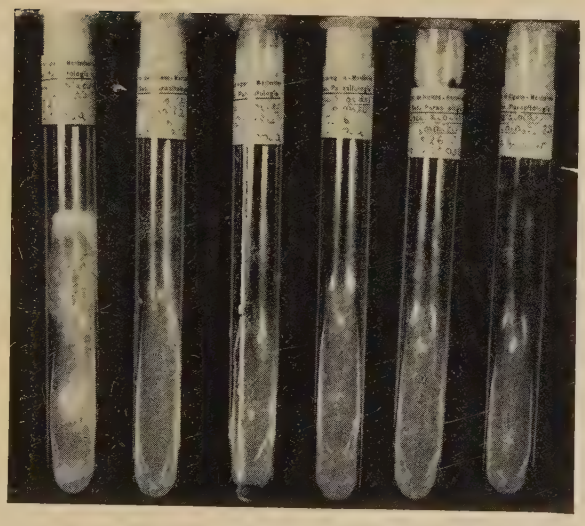
5 MACKINNON, J. E. Zimologia Médica. Imp. El Siglo Ilustrado, Montevideo 1946.

6 NEGRONI, P. y RADICE, J. C. A proposito de *Pseudococcidioides Mazzai* Fonseca, 1928 y de *Trichosporon proteolyticum* Negroni y Villafañe-Lastra, 1938 Rev. Arg. Dermatosifilografía *30* (3/4):219—223, 1946.



Cepa 826 *Coccidioides immitis*

Auxanograma de compuestos hidrocarbonados.



Cepa 826 *Coccidioides immitis*

Auxanograma de compuestos nitrogenados.

Estudio de las propiedades biológicas de varias cepas de hongos patógenos causantes de la Cromomicosis, y de especies vecinas saprofitas y patógenas [1]

L DE MONTEMAYOR [2]

(17. 9. 1948)

La cromomicosis llamada cromoblastomicosis por CARRIÓN y otros (1), es de todos bien conocida. Infección crónica causante de lesiones vegetantes, de tipo nodular o verrucoso, localizada generalmente en las extremidades, donde suelen producirse con predilección las heridas que son puerta de entrada a los hongos que son agentes etiológicos de la enfermedad.

El estudio de las propiedades biológicas de los hongos patógenos es siempre importante, en especial, aquellos géneros y especies cuya morfología es, o muy compleja, o muy pobre. En efecto, ateniéndose sólo a la morfología, siempre se plantean intrincados problemas para la identificación, explicables, si se tiene en cuenta que la morfología macro y microscópia, presenta diferencias y variaciones que están en función de muchos factores (temperatura, pH, composición del medio, etc.) ¿Hasta qué punto debe darse importancia a las diferencias morfológicas?

Nosotros creemos que ambos métodos de estudio (estudio de las propiedades biológicas, y estudio de la morfología) se completan el uno al otro y sobre todo, si se eligen propiedades biológicas de comprobada estabilidad, y técnicas precisas de fácil realización, que puedan ser repetidas en idénticas condiciones, por los investigadores en cualquier parte del mundo.

Estas ideas nos llevaron a estudiar bajo el punto de vista arriba expresado, varias cepas de hongos patógenos, agentes de la cromomicosis y otros saprofitos y patógenos vinculados taxonómicamente a los primeros.

Cepas estudiadas

Cepa No. 536: *Phialophora verrucosa* (cepa uruguaya aislada por J. E. Mackinnon) (4)
Cepa No. 556: *Phialophora verrucosa* (cepa Medlar)
Cepa No. 1001: *Phialophora compactum* (cepa aislada en Venezuela)
Cepa No. 633: *Phialoconidiophora Guggenheimia* (cepa de M. Moore)
Cepa No. 211: *Phialophora Pedrosoi* (cepa enviada por N. da Silva) (Río Grande del Sur).

---

[1]) Trabajo efectuado durante la beca de 1 año, ocorgada al autor para realizar estudios de Micología, en el Departamento de Parasitología del Instituto de Higiene de Montevideo.

[2]) Instructor en la Cátedra de Bacteriología y Parasitología del Prof. Dr. Briceño-Iragorry. Fac. de Med. Univ. Centr. de Venezuela.

Cepa No. 212: *Phialophora Pedrosoi.* (Cepa enviada por N. da Silva Rio Grande del Sur).
Cepa No. 283: *Torula Jeanselmei* (Cepa Langeron)
Cepa No. 1072: *Phialophora Jeanselmei* (Cepa recibida de Ch. Emmons, aislada de un micetoma de la mano. Arch. of path. *39*: 364—368, 1948).
Cepa No. 1073: *Phialophora Jeanselmei.* Recibida de Ch. Emmons, con las siguientes indicaciones. "Was isolated from a patient in Newarck Beth. Israel Hospital and was sent to me by Dr. Phillip Beerman".
Cepa No. 576: *Hormodendrum (Cladosporium) sp.*
Cepa No. 558: *Hormodendrum (Cladosporium) sp.*

Técnicas

Usamos las técnicas utilizadas por MACKINNON, FERRADA y MONTEMAYOR (2), empleadas con éxito por nosotros en Montevideo y, en otras partes, por MERIÑO-GONZÁLEZ en Chile (3).

Observando el cuadro adjunto, podemos establecer varios grupos de cepas, por su similitud o diferencias en el auxanograma de los hidratos de carbono y de los compuestos nitrogenados, y sus propiedades proteolíticas.

1er. Grupo. Formado por las cepas No.: 536—556—1001—633—211—212.
Caracterizadas por tener una temperatura óptima de 37° C (termófilo). La glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, peptona y asparagina son utilizados.
La lactosa, urea, nitrato de potasio y sulfato de amonio, no son asimilados. Sin acción proteolítica sobre la gelatina, suero de Loeffler y leche. Carecen de poder amilolítico.
Todas estas cepas han sido aisladas de casos de cromomicosis.

2º. Grupo. Formado por las cepas No.: 283—1072—1073.
Caracterizado por tener una temperatura óptima de 29—30° C.
La glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, peptona, urea, asparagina, sulfato de amonio y nitrato de potasio son asimilidos. *La lactosa no es asimilada. Sin acción proteolítica sobre la gelatina, suero de Loeffler y leche. Carecen de poder amilolítico.*
Este grupo de hongos son agentes de maduromicosis con gránulos negros, taxonómicamente relacionados con los anteriores, por pertenecer al género *Phialophora.* Los agentes de esta enfermedad son ampliamente estudiados por nosotros, en otro trabajo todavía en preparación (2).

3er. Grupo. Formado por las cepas No. 576 y 558. Se caracterizan por una temperatura óptima *que es la del ambiente* (20—25°). Francamente no termófilo. *Asimilan la lactosa y todos los azúcares y compuestos nitrogenados probados. Tienen extraordinario poder proteolítico sobre la gelatina, suero de Loeffler y leche.*
Las cepas aquí estudiadas son dos: *Hormodendrum (Cladosporium) sp.* Aislados de otros cultivos, donde aparecieron como contaminantes, los hemos escogido para este estudio, como término de comparación, ya que dentro de este grupo, existen especies a las que se les ha probado relevante papel patógeno (10).

Interpretatión

Los hechos arriba anotados nos permiten diferenciar claramente estos tres grupos, de tal manera, que es fácil separar nítidamente en las cepas estudiadas los *Hormodendrum* saprofitos de los patógenos, haciéndose posible, descartar los primeros. (Nº 558 y 576).

En segundo lugar, *Phialophora Jeanselmei* afin en cuanto a morfología

a *Phialophora verrucosa* es fácil diferenciarla de ésta, siendo idéntica a *Torula Jeanselmei* de Langeron quedando separadas las fialoforas agentes de cromomicosis, de las fialoforas agentes de maduromicosis a granos negros.

La morfología macro y microscópica, fué estudiada en los medios utilizados por MACKINNON (4), CARRIÓN (1), MOORE y ALMEIDA (5) y EMMONS (7). Hemos podido encontrar todas las formas de esporulación señaladas por los autores, aunque no nos ha sido posible precisar con exactitud, la predominancia de un tipo de esporulación sobre otro. No insistimos sobre este punto, ya detenida y profundamente estudiado por dichos autores en varios trabajos.

El hecho de que los auxanogramas y las propiedades proteolíticas, no establecen diferencia entre los géneros *Phialophora* y *Fonsecaea* y dentro de éste, los diversos tipos y variedades, parece apoyar la opinión de THOM (8), es decir, que estos hongos no deberían colocarse en géneros diferentes. Para LANGERON existe un solo género: *Phialophora* (9). En cuanto al número de especies, como siempre es variable según el criterio personal. No obstante, nuestros resultados no se opondrían a un criterio unicista, aunque desde el punto de vista morfológico puro pueden distinguirse varias especies (11).

Resumen

Se estudian desde el punto de vista biológico 11 cepas de hongos, tanto saprofitos como patógenos, vinculados a la etiología de la cromomicosis, se forman tres grupos distintos según sus propiedades biológicas.

1° Hongos de la cromomicosis, cepas N° 536-556-1001-211-212.
2° Hongos de la maduromicosis a gránulos negros, cepas N° 283-1072-1073.
3° Hongos saprofitos, cepas N° 576-558.

Se hace notar la muy estrecha vinculación biólogica, entre las cepas aisladas de casos de cromomicosis estudiadas, y las diferencias existentes con las otras.

He de terminar expresando mi agradecimiento al Profesor Dr. Mackinnon, por sus valiosas indicaciones y colaboración.

Summary

The assimilation of sugars and nitrogenous compounds by the methods utilized by Mackinnon and collaborators at the "Instituto de Higiene" of Montevideo allow us to appreciate that the agents of chromomycosis are so closely related as to justify the opinion of Thom and Langeron; that is to say, that they may be joined together in only one genus. The number of species is a problem more difficult but our results are not against a unicist criterion. *Phialophora compactum* has the same biological properties as *P. verrucosa* and *P. Pedrosoi.*

On the other hand *Phialophora Jeanselmei,* an agent of black maduromycosis has different biological properties as the agents of chromomycosis.

Common saprophytic strains of the genus *Hormodendrum,* well known contaminants of our cultures, may be easily distinguished from the agents of chromomycosis which may produce an hormodendrum-like type of growth.

Referencias

1. CARRIÓN, A. L. y SILVA, M. — Chromoblastomycosis and its etiologic fungi. In Biology of Pathogenic fungi by W. J. Nickerson. Annales Cryptogamici et Phytopathologici, *6*: 20—62, 1947.
2. MACKINNON, J. E., FERRADA, L. V. y MONTEMAYOR, L. — Investigaciones sobre las maduromicosis. En preparación.

3. MERIÑO-GONZALES, H. — Estudio del Pie Madura en Chile, con el primer caso de Micetoma podal maduromicósico de granos negros. Tesis de Doctorado. Fac. Med. de la Univ. de Santiago de Chile. 54 p. Imp. Carabineros. Santiago 1946.
4. MACKINNON, J. E. — Estudio del primer caso uruguayo de cromoblastomicosis y „Revista Crítica" sobre la enfermedad Arch. Ur. Med. Cir. y Especialidades; *5*: 201—226, 1934.
5. MORRIS MOORE y F. P. DE ALMEIDA. — New Organisms of Chromomycosis, Annals of the Missouri Botanical Garden; *23*: 543—552, 1936.
6. CARRIÓN, A. L. — Chromoblastomycosis. The Puerto Rico Journ. of Public Health and Tropical Med.; *11*: 633—682, 1936.
7. EMMONS, C. W. and CARRIÓN, A. L. — The Phialophora type of sporulation in *Hormodendrum Pedrosoi* and *Hormodendrum compactum*. Puerto Rico Jour. of Public Health and Tropical Med.; *11*: 703—710, 1936.
8. THOM CH. — Naming molds. J. of the Washington Ac. of Sciences; 30: 49—64, 1940.
9. LANGERON, M. — „Precis de Micologie". Masson ed. París, 1945.
10. O'DALY, J. A. — Rev. San. y Asist. Social (Caracas); *8*: 665, 1943.
11. BRICEÑO-IRAGORRY, L. — Sobre Cromoblastomicosis. Lit. y Tip. Vargas (Caracas, 1939).

CUADRO DEMOSTRATIVO DE LAS PROPIEDADES BIOLOGICAS DIFERENCIALES

	CEPAS ESTUDIADAS	OPTIMA TEMPERATURA			UTILIZACION DE LOS AZUCARES						UTILIZACION DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS						ACCION PROTEOLITICA		
		20°	30°	37°	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Control	Urea	NO_3K	$(NH_4)_2SO_4$	Peptona	Asparagina	Control	Gelatina	Suero de Loeffler	Leche
AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSIS	536. **P. verrucosa.** Cepa Mackinnon	+	++	+++	+++	++	++	+	++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
	556. **P. verrucosa.** Cepa Medlar	+	++	+++	+++	++	++	+	++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
	1001. **P. compactum.** Cepa venezolana	+	++	+++	+++	++	+++	+	+++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
	633. **P. Guggenheimia.** Cepa Moore y Alm.	+	++	+++	+++	++	+++	+	+++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
	211. **P. Pedrosoi.** Cepa N. da Silva	+	+	+++	+++	++	++	+	++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
	212. **P. Pedrosoi.** Cepa N. da Silva	+	+	+++	+++	++	++	+	+++	+	+	+	+	+++	++	+	—	—	—
MADUROMICOSIS	283. **T. Jeanselmei.** Cepa Langeron	+	+++	++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—
	1072. **P. Jeanselmei.** Cepa Emmons	+	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—
	1073. **P. Jeanselmei.** Cepa Emmons	+	+++	++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—
CONTAMINANTES	576. **Hormodendrum sp** Contaminante	+++	++	+	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
	558. **Hormodendrum sp** Contaminante	+++	++	+	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+

Madurella grisea n. sp.

A new species of fungus producing the black variety of Maduromycosis in South America *)

by

Juan E. Mackinnon [1]), Luis V. Ferrada-Urzúa [2]) and
Lorenzo Montemayor [3])

(15. X. 1948)

Our knowledge about maduromycosis has advanced very slowly and the confusion concerning the identification of the agents of the black variety is greater than in any other mycosis.

From some time ago we have been studying five strains of fungi isolated from five cases of black Madura-foot in South America and seven other strains which are well known causes of the same disease in other continents of the World. The five South American strains belong to the same species whose description may be found at the end of this paper in Latin, English and Spanish. We named it *Madurella grisea*. The other species studied are: *Madurella americana, Madurella Ikedae, Phialophora Jeanselmei, Glenospora Clapieri* and *Monosporium sclerotiale.*

Our studies comprehend the study of the biological properties which are summarized in a table, the appearance of the giant colonies on Sabouraud's glucose agar and a mycological study on slide cultures. Before the exposition of our methods and results we believe it necessary to write about the origin of the cultures assayed.

I. List of the cultures studied

Madurella grisea n. sp. Strain 579. Isolated in Paraguay from Madura foot by Delamare and Gatti (11).

Madurella grisea n. sp. Strain 852. Isolated in Montevideo from black grains from a case of Madura foot. Case of Dr. S. Mazza from Argentina (Chaco).

Madurella grisea n. sp. Strain 853. Isolated by Dr. S. Mazza from Madura foot of the black variety in Argentina (Chaco).

Madurella grisea n. sp. Strain 927. Isolated from black Madura foot in Chili by Meriño-Gonzalez (21).

Madurella grisea n. sp. Strain 1.000. Isolated from black Madura foot in Venezuela by one of us (Montemayor).

Madurella americana Gammel, Miskdjian and Thatcher, 1926. Strain 879. Gammel's strain isolated from black Madura foot in United States (16). Received from the Instituto Oswaldo Cruz (Rio Janeiro).

*) These studies have been carried out at the "Instituto de Higiene Experimental". Facultad de Medicina. Montevideo-Uruguay.

1) Associate Professor of Parasitology at the „Facultad de Medicina". Montevideo-Uruguay.

2) Cátedra de Bacteriología. Facultad de Medicina. Santiago-Chile.

3) Cátedra de Bacteriología y Parasitología. Facultad de Medicina. Caracas-Venezuela.

Madurella Ikedae Gammel, 1927. Strain 261. Gammel's strain isolated from black Madura foot in United States. Received from the "Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris" (15).

Phialophora Jeanselmei (Langeron, 1928) Emmons, 1945. Strain 283. Langeron's strain received from the "Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris". Isolated from a case of black Madura foot from Martinica (19).

Phialophore Jeanselmei (Langeron, 1928) Emmons, 1945. Strain 1.072. Emmons's strain (13) received from the National Institute of Health (Bethesda). Isolated from black maduromycosis of the hand; case of Symmers and Sporer (31).

Phialophora Jeanselmei (Langeron, 1928) Emmons, 1945. Strain 1.073. Received from the National Institute of Health from Emmons who isolated it from a case of Dr. Beerman. Unpublished case.

Glenospora Clapieri Catanei, 1927. Strain 226. Original strain from the case of Montpellier, Catanei and Clapier (22) received from the "Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris".

Monosporium sclerotiale Pepere, 1914. Strain 934. Received from P. Negroni.

II. Methods

Appearance of growth. Giant colonies on Sabouraud's glucose agar were studied after 40 days in the incubator at 27—30° C.

Mycology. Slide cultures and the following media were used: 2 per cent glucose, 1 per cent peptone soft (0.6%) agar. After 7—10 days in the incubator (27—30° C) the slide cultures were dried, then covered with a thin collodion film and afterwards colored with aqueous 0.2 per cent erythrosine, 1 per cent orange G; or, with 1 per cent cotton blue solution in Amann's lactophenol.

Optimal temperature. It was determined by placing the cultures at three temperatures: at 37 C° in the incubator, at 27—30° C and at the room temperature during the Summer; that is to say: 18—25° C.

Utilization of nitrogenous compounds. Two basal media were used: AN and ANK. The composition of the medium AN was: monobasic potassium phosphate 1 gr., magnesium sulphate 0.5 gr., potassium chloride 0.5 gr., ferrous sulphate 0.01 gr., dextrose 30 gr., glycerine 50 gr., agar 20 gr. and distilled water 1 liter. The medium ANK is simpler: monobasic potassium phosphate 0.5 gr., dextrose 10 gr., agar 20 gr. and distilled water 1 liter. These media were poured in tubes (8 to 10 cc to each tube) and sterilized 30 minutes at 115° C. After solidification and the day before the inoculation, 20 drops of a solution of a nitrogenous compound, sterilized by filtration, were added: 2 per cent urea, 2 per cent asparagine, 2 per cent ammonium sulphate, 1 per cent potassium nitrate and 10 per cent bactopeptone (Difco). To other control tubes 20 drops of distilled water were added. The reading of the results was done 7, 14 and 30 days after the inoculation. As we always observed some growth in the control tube (without any nitrogenous compound) we noted this result with one +. A sharp increase of the growth (as compared with the control) was noted +++, and intermediate results with ++. A lack of growth means a technical failure with the inoculation, or a toxic effect of the nitrogenous compound assayed. Consequently, in such a case we use to repeat our experiments with lower concentrations of the toxic nitrogenous compound. Fortunately, we did not observe toxic effects on the strains assayed in the present research.

Utilization of sugars. Two basal media were prepared: AA and AAK. Medium AA: monobasic potassium phosphate 1 gr., magnesium sulphate 0.5 gr., potassium chloride 0.5 gr., ferrous sulphate 0.01 gr., asparagine 1.5 gr., bactopeptone (Difco) 10 grs., agar 20 gr. and distilled water 1 liter. Medium AAK: asparagine 05 gr., monobasic potassium 0.5 gr., agar 20 gr. and distilled water 1 liter. We proceeded as before but adding 20 drops of solutions of the following sugars in a concentration of 20 per cent: glucose, maltose, sucrose, lactose and galactose. These solutions were sterilized by filtration. Solutions of some disaccharides as maltose and sucrose must not be used after one month and the results must be registered before the 15th day; otherwise negative results may become positive. These difficulties are not due to adaptations of

the fungi to a certain sugar. It is obvious that the sugars used must be as pure as possible.

Proteolytic activity. It was assayed with milk, gelatine and Loeffler medium (inspissated serum with broth). The action on the milk was assayed with plain milk in test tubes with 10 cc each one. The results were read each week during 2 months.

Hydrolysis of the starch. The strains were cultivated for 4 to 7 days in Petri dishes with broth agar with 0.2 per cent soluble starch (Merck). The hydrolysis was proved with Lugol's solution.

III. Results

The biological properties of the new species may be well appreciated in the table. Nevertheless, we must warn that on media with lactose the growth of *M. grisea* may be somehow better than on the media without any sugar (control). We think that such a little increasing, which cannot be always appreciated, might be due to some impurities of the lactose.

Our results allowed us to distinguish clearly five different types of fungi and that the five South American strains are identical and constitute our *type II.* The Gammel's species (*M. americana* and *M. Ikedae*) constitute our *type I.* The three strains named *Phialophora* (*Torula*) *Jeanselmei* show the same biological properties and are joined in the *type III. Glenospora Clapieri* is the most exigent species because it utilizes only the peptone and the glucose: *type IV.* On the other hand *Monosporium sclerotiale* utilized all the five sugars and the five nitrogenous compounds assayed: *type V.*

The appearance of the cultures on Sabourauds' glucose agar is not an accurate procedure to distinguish the five *types* of fungi. The South American strains produce colonies built up by a hard thick black mycelial mass with furrows and irregularities more or less hidden by a white-grayish pubescence (fig. 2) which later on becomes rather brownish. A diffusible brown pigment is produced. One strain (fig. 3) produced scarce aerial mycelium and consequently the folds of the mycelial mass and its almost black colour are more evident. The hyphae are rather rigid and straight (fig. 5) and only a few intercalary and terminal chlamydospores were seen in some sectors of some slide cultures of two strains (fig. 4).

Phialophora Jeanselmei also produces a black mycelial mass covered by a grayish pubescence, but the mycelial mass is not so folded and covers a wider surface of the medium which did not become brownish pigmented. Typical conidia are abundant and the species is easily distinguished from *M. grisea.*

M. americana produces colonies of a wide diameter and thinner than those of the two species named before. The colonies are built by a brown-blackish mycelium covered by a short white aerial mycelium which sometimes becomes yellowish and pale ochrey. A brown diffusible pigment is produced. By means of dissociation we have been able to obtain variants which were more or less deeply coloured. Sometimes we observed a zonated aspect produced by some rings more deeply coloured than the other zones of the colony. On slide cultures we observed frequently intercalary and terminal chlamydospores (10 to 16 μ) as well as appressoria-like structures.

M. Ikedae produces wide colonies built by an ochraceous mycelium covered by a short aerial pubescence, first white and later on yellowish and ochrey. Chlamydospores were rarely observed.

M. sclerotiale forms a hard membrane with folds and irregularities. The mycelial mass is built up by a brown-reddish mycelium covered by a white aerial mycelium. Violet and purple shades appeared in several places

of the giant colony. Conidia of both the cephalosporium and monosporium types were observed.

IV. Nomenclature of the five types of cultures studied

The first binary combination which may be discussed is *Madurella mycetomi* (Laveran 1902) Brumpt 1905. Both LAVERAN in one case (20) and BRUMPT in three cases (6 and 7) of Madura foot, described the fungus in the parasitical form; that is to say: the black grains. They described black, hard and compact grains. These descriptions exclude some species producing soft and hollow grains but they are not sufficient for the identification of a species. Black, hard and compact grains may be produced by fungi of the types I, II and IV described in this paper and may be by other unknown species. Consequently, it is impossible to know what type of fungus deserves the name *M. mycetomi.* Moreover, it is also impossible to know positively if Laveran and Brumpt dealed with one or with two or even several species.

NICOLLE and PINOY (23) in 1908, were the first to cultivate a madurella, but as the grains were somewhat different from those of LAVERAN and BRUMPT, they used a new name for their cultures: *Oospora tozeuri.* Later on, PINOY (26) named his species *Madurella tozeuri.*

BRAULT (2) and BRAULT and MASSELOT (5) in 1911—1912, published a new case with cultures which they think similar to those of NICOLLE and PINOY. Nevertheless, in another papers BRAULT (3 and 4) affirms that his cultures are not identical with those of NICOLLE and PINOY, and named his strain: *Madurella mycetomi.* After the publication by BRAULT (3), PINOY wrote a different brief note (26) describing *M. mycetomi* and *M. tozeuri.* Thes two descriptions are so similar that it is impossible for us to appreciate what are the differences between the cultures of the two species. Both descriptions refer to white colonies which become yellowish after some time but not to black or gray colonies like those produced by our South Americain strains.

Colonies similar to those of NICOLLE and PINOY and of BRAULT were described by PUYHAUBERT and JOLLY (29 and 30) in a strain isolated in the Ivory Coast (W.Africa) and by NOC and JOUENNE (24) in Senegal from three cases. All these cultures were named *M. mycetomi.* On the other hand, BLANC and BRUN (1) isolated a strain which was named *Madurella tabarkae* although it does not seem very different from the others.

After all the reasons exposed above, our conclusions are that the combination *Madurella mycetomi* must be rejected because it is a *nomen dubium,* and that the species described by the French authors are very different from our South American strains. Nevertheless, the strains of the French authors are very similar to those isolated in United States by GAMMEL and collaborators (15 and 16): *M. americana* and *M. Ikedae.*

In 1912, CHATTERJEE (10) described a culture isolated from an Indian case of black maduromycosis. CHATTERJEE's descriptions is almost coincident with our own's cultures appearance and quite different from the descriptions of the French authors. CHATTERJEE thought that he had cultivated the agent of the CARTER's classic black mycetoma but he did not name his strain. This prudent attitude seems to be easily explained by the following words of CHATTERJEE: "The position of the fungus in the class *Hyphomycetes* is evident from the characters described above, and is therefore a distinct fungus from the fungus of the white Mycetoma. It is to be determined by future experiments whether in all cases of Madura foot of the

melanotic variety, the same fungus is found". It seems to us quite evident that the author did not use the combination *Madurella mycetomi* because of the possibility that the cause of the black maduromycosis might be more than one fungus and because in such a case the named combination would be a *nomen dubium*. The next facts justified CHATTERJEE's attitude.

The aspects of the South American strains agree with CHATTERJEE's description but his cultures are not available from the main type cultures collections of the World and we think we must be rather prudent and we may not affirm the identity between Indian and South American strains. We think that our descriptions and cultures will allow other research workers to affirm or to deny this identity which may have some biogeographical significance.

CHALMERS and ARCHIBALD in 1916—1917 (9) described a new species, *Glenospora khartoumensis* whose blackish or grayish colonies are similar to those of the South American strains. Nevertheless it produces abundant and rather small aleuriospores and it does not hydrolyze the starch. Consequently our strains cannot be identified with *G. khartoumensis* isolated in Egypt. CHALMERS and ARCHIBALD did not adequately describe a second species, *Glenospora Semoni*, (9 bis) which nevertheless may be nearer to the South American strains than *G. khartoumensis* because it did not produce aleuriospores. DODGE (12) considered *G. Semoni* as a *nomen nudum* and we believe it is very difficult (if not impossible) to identify *G. Semoni* on the basis of CHALMERS and ARCHIBALD description. Cultures of *G. Semoni* and *G. khartoumensis* are not available and we would be too audacious, identifying our strains with *G. Semoni*. Nevertheless, we recognize as very suggesting that *G. Semoni* was isolated from an Indian, although in France.

Other species of the genus *Madurella* have been described in South America. PARREIRAS HORTA (quoted by DA FONSECA, 1930) named *M. Oswaldoi* a yellowish or ochrey strain, rather similar to *M. americana* and to the species of the French authors. Nevertheless, some aspects approaches *M. Oswaldoi* to our strains. PIRAJÁ DA SILVA (27) described another species named *M. Ramiroi* but it is rather difficult to us to interpret the description of this species. Neither cultures of *M. Oswaldoi*, nor of *M. Ramiroi* are available from the cultures collections and it is impossible to discuss the relationship of these species with our strains. The same opinion was advanced by DELAMARE and GATTI (11).

It is also impossible, and by the same reasons, to discuss the identity of *Madurella lackawanna* Hanan and Zurett (17) isolated from black maduromycosis in the United States. Hanan and Zurett claim that their species did not grow in a medium with peptone but it did grow when liver was added to the medium. This is the most striking characteristic but no cultures are available. A very doubtful case was described by PUESTOW (28) who isolated a fungus which was identified with *Aspergillus nidulans*.

Madurella bovoi Brumpt 1910 (8), was not cultivated and *Monosporium sclerotiale* Pepere, is very different from our strains.

Consequently, it is impossible to identify on the basis of scientifical and objective facts, our South American strains with any other species and we are obliged to create a new name: *Madurella grisea n. sp.* Nevertheless, we must emphasize that our strains seem to be rather similar to that described by Chatterjee in India, but CHATTERJEE did not name his strain.

V. SUMMARY AND CONCLUSIONS

1st. Twelve strains of fungi isolated from cases of black maduromycosis (black Madura foot), from several regions of the World, were studied and we reached the conclusions that the five strains isolated in South America belong to the same species.

2nd. The South American species could be comparatively studied with: *Madurella americana, Madurella Ikedae, Phialophora Jeanselmei, Glenospora Clapieri* and *Monosporium sclerotiale.* The conclusion was that the South American species is different from the named species.

3rd. It was impossible to identify our strains with other species producing black maduromycosis on the basis of the forthcoming descriptions. Nevertheless, we recognize that very striking similarities exist between our South American cultures and the description by CHATTERJEE of a strain isolated in India. CHATTERJEE did not name his strain and as it is not available from the main type culture collections of the World, we are unable to affirm or to deny, with scientifical reasons, the identity with our own strains.

4th. Consequently, we considered the South American species as a new one and we named it *Madurella grisea n. sp.*

5th. The combination *Madurella mycetomi* (Laveran 1902) Brumpt 1905 is rejected because: A) It is considered as a *nomen dubium.* B) The French authors like PINOY, BRAULT, PUYHAUBERT and JOLLY, and NOC and JOUENNE described under the name *M. mycetomi,* cultures which were very different from our South American strains.

6th. We must emphasize that the biological characteristics, like the assimilation of nitrogenous compounds and sugars have been very useful for the identification of species, whenever we used very pure compounds and very rigorous methods. They provide us with a biological criterion which was a control of the strictly botanical studies, although they are not necessary.

VI. Description of Madurella grisea

Madurella grisea Mackinnon, Ferrada et Montemayor, n. sp.

In agaro glucosato Sabouraudi, coloniae durae congerie miceliali quasi nigra plicataque constructae, villositate albo-grisea tectae. Cultivationes veterae colorem avellaneum, nunquam flavum sumunt. Villositas plicas micelialis congeriei tegit, sed stipites nonnulli raram et breviorem villositatem procreare possunt et ideo obscuriores sunt coloniae et plicae visibiliores. Medium circa colonias avellaneo colore tingitur. In Czapekii medio liquido, coloniae sphericae submersae, micelio ialino extructae, punctu centrali obscuro, gignuntur; sero crassi velaminis nigrescentis nascimentum, observari potest. Iphae moniliformes (3—4 μ) aut cilindratas (2—3 μ) fuliginosas, ramificatas et saeptatas se praebere possunt. Istae graciles juvenes iphas aereas, fere ialinas, procreant, quae villositatem aut micelium aereum constituunt. Micelius cilindratus in magna parte stipitum praevalet, sed in uno micelius moniliformis praevalebat. Stipes ipse est qui creat micelium aereum brevem et exiguum qui ostendebat plicationem et colorem nigrescentem micelialis congeriei in colonia gigante. Clamidosporae intercalares atque terminales crassa pariete (4—7 × 3—4 μ) rarissime visibiles erant et aliqui stipites carebant proprietate tales formas resistentiae creandi.

Sacchara sequentia assimilantur: glucosium, maltosium, galactosium et saccharosium; lactosium nunquam adhibetur. Composita nitrogenata sequentia assimilantur: urea, asparagina, sulfuratum amoniaci, nitratum Natrii et Kalii atque pepto. Temperatura optima 30° C. Videtur tamen bonum incrementum etiam cum 37° C. Levis et tardissima gelatinae lactisque proteolysis; tardissima et levissima proteolysis seri coagulati. Amylum hidrolizatur.

Habitat: species inventa fuit in variis regionibus Americae meridionalis parasitans hominis texta, maduromicosim procreans pedis, dermam affectans, musculos, juncturas et ossa. In textis, micelius procreat granulos duros, nigros ac verrucosos, usque ad 2 mm diametro. Granuli micelio fuliginoso (2—5 μ) formantur; clamidosporis peripheris avellaneis generaliter 15—20 μ diametro, interdum etiam majoribus et copiosa substantia interstitiali avellanea.

On Sabouraud glucose agar hard colonies built by an almost black folded mycelial mass covered by a white-grayish pubescence. Old cultures become brown *(avellaneus)* but never yellowish. The pubescence hiddens the folds of the mycelial mass but some strains produce scarce and shorter aerial mycelium and consequently the colonies are darker and the folds are more visible. The medium becomes brown around the colonies. In Czapek liquid medium spherical submerged colonies of hyaline mycelium with a dark center are produced; later on, a dark veil may cover the surface. Hyphae may be moniliform (3—4 μ) or cylindric (2—3 μ), fuligineous, branched and septate. These give rise to the slender, almost hyaline young aerial hyphae. The cylindric mycelium predominates in most of the strains but in one strain the moniliform hyphae predominate. This strain produce scarce pubescence and the folding of the mycelial mass is quite visible in the giant colonies. Intercalary and terminal thick walled chlamydospores (4—7 $\times$ 3—4 μ) are very scarce and some strains failed to produce resting spores. The following sugars are assimilated: glucose, maltose, galactose and sucrose; lactose is not assimilated. The following nitrogenous compounds are assimilated: peptone, asparagine, urea, sodium and potassium nitrate and ammonium sulphate. Optimal temperature: 30° C; good growth is still observed at 37° C. Weak and very slow proteolysis of the gelatine and milk, very weak and very slow proteolysis of the coagulated serum. Starch is hydrolyzed.

Habitus. The species has been found in several regions of South America in the human tissues producing maduromycosis of the feet involving the dermis, the muscles, the joints and the bones. In the tissues the mycelium produces hard, verrucous and black grains up to 2 mm. The grains are formed by a fuligineous mycelium (2—5 μ), peripheral brown chlamydospores usually 15—20 μ in diameter but sometimes larger, and an abundant intersticial brownish mass.

En agar glucosado de Sabouraud colonias duras formadas por una masa micelial casi negra y plegada, cubierta por una vellosidad blanco-grisácea. Los cultivos viejos toman tintes marrones *(avellaneus)* pero jamás amarillentos. La vellosidad oculta los pliegues de la masa micelial, pero algunas cepas pueden producir escasa y más corta vellosidad y en consecuencia las colonias son más obscuras y los pliegues son más visibles. El medio se tiñe de marrón alrededor de las colonias. En medio líquido de Czapek se desarrollan colonias esféricas sumergidas, formadas por micelio hialino con un punto central obscuro; tardíamente se puede observar la formación de un grueso velo negruzco. Las hifas pueden ser moniliformes (3—4 μ) o cilíndricas (2—3 μ), fuliginosas, tabicadas y ramificadas. Estas dan nacimiento a las delgadas jóvenes hifas aéreas, casi hialinas, que forman la vellosidad o micelio aéreo. El micelio cilíndrico predomina en la mayor parte de las cepas pero en una predominaba el micelio moniliforme. Esta cepa es la que produce micelio aéreo corto y escaso que dejaba visible el plegamiento y el color negruzco de la masa micelial en la colonia gigante. Clamidoesporos intercalares y terminales de gruesa pared (4—7 $\times$ 3—4 μ) fueron vistos pero en número escasísimo y algunas cepas carecían de la propiedad de producir tales formas de resistencia. Los siguientes azúcares son utilizados: glucosa, maltosa, galactosa y sacarosa; la lactosa no es utilizada. Los siguientes compuestos nitrogenados son asimilados: urea, asparagina, sulfato de amonio, nitrato de sodio y de potasio y peptona. Temperatura óptima: 30° C; sin embargo, todavía se observa buen crecimiento a 37° C. Debil y muy lenta proteolisis de la gelatina y de la leche; muy lenta y muy debil proteolisis del suero coagulado. El almidón es hidrolizado.

Habitat. La especie ha sido encontrada en varios países de América del Sur, parasitando los tejidos del hombre, produciendo maduromicosis de los piés afectando el dermis, los músculos, las articulaciones y los huesos. En los tejidos el micelio produce gránulos duros, negros y verrucosos hasta de 2 mm de diámetro. Los gránulos están

formados por un micelio fuliginoso (2—5 μ), clamidoesporos periféricos marrones, generalmente de 15 a 20 μ de dimetro pero a veces mayores aún, y una substancia intersticial abundante, marrón.

Acknowledgments

The authors are deeply indebted to the late Dr Salvador Mazza (head of the "Misión de Estudios de Patología Regional Argentina") for two strains isolated from Argentinian cases. Also to our friends: Chester W. Emmons (National Inst. of Health; Bethesda), Pablo Negroni (Inst. Bacteriológico de Buenos Aires), A. E. de Arêa Leão (Inst. Oswaldo Cruz, Rio Jaueiro) and H. Meriño-Gonzalez (Faculdad de Medicina, Santiago-Chile) for the cultures which made it possible to do comparative studies.

The photos of this paper have be shot by M. Santarosa with his usual skilfulness.

List of references

1 BLANC G. and BRUN G. — Nouveau cas de Mycétome à grains noirs observé en Tunisie. Bull. Soc. Path. Exotique; **12**: 741—748, 1919.

2 BRAULT J. — Mycose du pied à grains noirs chez un jeune indigène algérien, avec photographies microscopiques, culture et preparation histologique. Bull. et Mem. de la Soc. de Chirurgie; **37**: 530—533, 1911.

3 BRAULT J. — Mycétome à grains noirs observé en Algérie. Isolément du *Madurella mycetomi*. Ann. Derm. Syph.; **3**: 333—343, 1912.

4 BRAULT J. — Note sur les cultures de *Madurella mycetomi*. Bull. Soc. Path. Exotique; **6**: 407—409, 1913.

5 BRAULT J. and MASSELOT L. — Mycose du pied à grains noirs chez un indigène algérien. Arch. Paras.; **15**: 218—225, 1912.

6 BRUMPT E. — Sur le mycétome à grains noirs, maladie produite par une mucedinée du genre *Madurelle n. g.* Comp. Rend. Soc. Biol.; **58**: 997—999, 1905.

7 BRUMPT E. — Les mycétomes. Arch. Paras.; **10**: 489—572, 1906.

8 BRUMPT E. — Précis de Parasitologie. Masson et Cie. Ed. Paris, 1936.

9 CHALMERS A. J. and ARCHIBALD R. G. — A sudanese maduromycosis. Ann. Trop. Med. and Paras.; **10**: 69—222, 1916.

9bis CHALMERS A. J. and ARCHIBALD R. G. — Mycetoma and pseudomycetomatous formations. New Orleans Med. Surg. Jour. (American Soc. of Trop. Med.); **70**: 455—475, 1917.

10 CHATTERJEE G. C. — On the cultivation of black variety of Mycetoma. Cent. für Bakt.; I, **61**: 358—365, 1912.

11 DELAMARE G. and GATTI C. — Mycétome du pied à grains noirs. Bull. Soc. Path. Exotique; **24**: 80—84, 1931.

12 DODGE C. W. — Medical Mycology. The C. V. Mosby Co. Saint Louis, 1935.

13 EMMONS C. W. — *Phialophora Jeanselmei comb. n.* from mycetoma of the hand. Arch. Pathology; **39**: 364—368, 1945.

14 FONSECA O. DA. — O genero *Madurella* e os mycetomas produzidos pelas especies nelle contidas. Rev. Med. Cir. do Brasil; **38**: 262—269, 1930.

15 GAMMEL J. A. — The etiology of Maduromycosis. Arch. Derm. Syph.; **15**: 241—284, 1927.

16 GAMMEL J., MISKDJIAN H. and THATCHER H. S. — Madura foot (Mycetoma). The black grain variety in a native American. Arch, Derm. Syph.; **15**: 66—77, 1926.

17 HANAN E. B. and ZURETT S. — A new species of *Madurella*. Arch. Derm. Syph.; **37**: 947—966, 1938.

18 JEANSELME M. M., HUET L. and LOTTE. — Nouveau type de mycétome à grains noirs du à une *Torula* encore non décrite. Bull. Soc. Frac. de Derm. et de Syph.; **35**: 369—376, 1928.

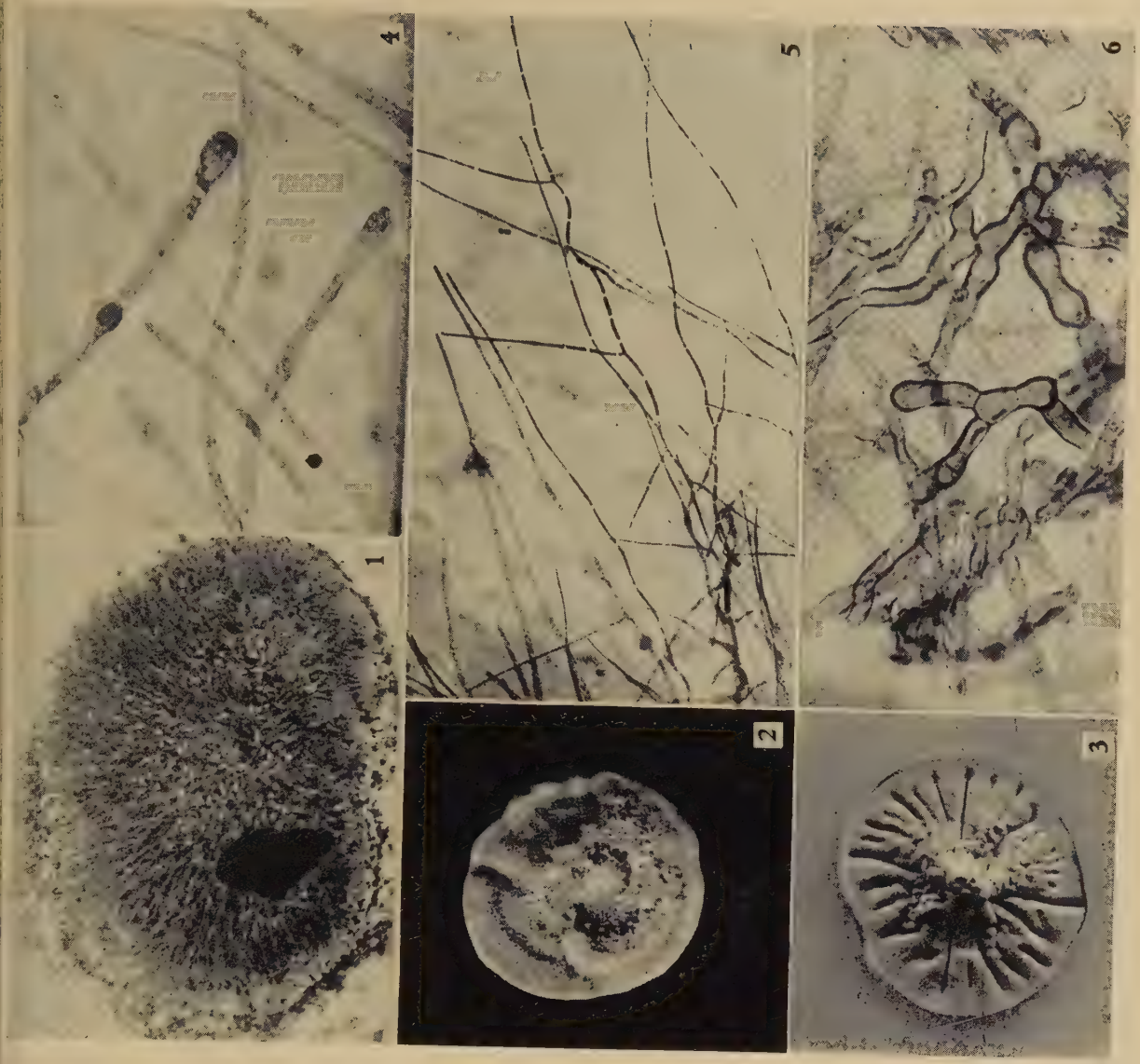
19 LANGERON M. — Mycétome à *Torula Jeanselmei* Langeron 1928. Nouveau type de mycétome à grains noirs. Ann. Paras; **6**: 385—403, 1928.

20 LAVERAN M. A. — Au sujet d'un cas de Mycétome à grains noirs. Bull. Ac. Méd. de Paris; III, 47: 773—776, 1902.
21 MERIÑO-GONZALEZ H. — Estudio del pié de Madura en Chile con el primer caso de Micetoma Podal Maduromicósico de granos negros. Thesis; 64 pag. Imprenta de Carabineros. Santiago, 1946.
22 MONTPELLIER J., CATANEI A. and CLAPIER P. — Etude d'un mycetome à grains noirs du a *Glenospora Clapieri* Catanei 1927. Bull. Soc. Path. Exotique; **20**: 502—511, 1927.
23 NICOLLE C. and PINOY E. — Un cas de mycétome à grains noirs. Culture et inoculation expérimentale. Bull. Soc. Path. Exotique; **1**: 95—99, 1908.
24 NOC F. and JOUENNE. — Les mycétomes à grains noirs du Sénégal. Ann. Inst. Pasteur; **36**: 365—385, 1922.
25 PARREIRAS HORTA. — A Pathologia Geral Nros 1—4; 1919 (Quoted by Fonseca), Rev. Med. Cir. do Brasil; **38**: 262—269, 1930.
26 PINOY E. — Note. Ann. de Derm. de Syph.; V, **3**: 341—343, 1912.
27 PIRAJA DA SILVA P. — Contribuição a micologia parasitaria do Brasil. Duas novas especies de fungos productores de maduromycose. Mem. do Inst. Butantan; **1**: 187—207, 1918—1919.
28 PUESTOW K. L. — Maduromycosis. A contribution to the study of Maduromycosis with report of a case of infection with *Aspergillus nidulans*. Arch. of Derm. and Syph.; 20: 642—664, 1929.
29 PUYHAUBERT A. und JOLLY R. — Note sur un cas de mycétome à grains noirs provoqué par un champignon du genre „Madurella". Arch. Med. Exp.; **28**: 441—445, 1918.
30 PUYHAUBERT A. and JOLLY R. — Note sur un cas de mycétome à grains noirs. Bull. Soc. Path. Exotique; **12**: 57—60, 1919.
31 SYMMERS D. and SPORER A. — Maduromycosis of hand with special reference to heretofore undescribed foreign body granulomas formed around disintegrated chlamydospores. Arch. of Pathology; **37**: 309—318, 1944.

Titles for the figures

Figure 1. *Madurella grisea n. sp.* — Section of a black grain in the tissues. Magnification: × 225.
Figure 2. *Madurella grisea n. sp.* — Strain 852. Giant colony on Sabouraud's glucose agar, aged 40 days. Magnification: × 1.
Figure 3. *Madurella grisea n. sp.* — Strain 927. Giant colony on Sabouraud's glucose agar, aged 40 days. Magnification: X 1.
Figure 4. *Madurella grisea n. sp.* — Strain 853. Intercalary and terminal chlamydospores (aleuriospores). Magnification: × 1.000.
Figure 5. *Madurella grisea n. sp.* — Strain 852. Slide culture. Cylindrical, straight hyphae. Magnification: × 333.
Figure 6. *Madurella grisea n. sp.* — Strain 927. Slide culture. Moniliform hyphae. Magnification: × 1.000.

TABLE XXII



BIOLOGICAL PROPERTIES OF 12 STRAINS OF FUNGI ISOLATED FROM CASES OF THE BLACK VARIETY OF MADUROMYCOSIS

TYPE No.	STRAIN No.	Assimilation of nitrogenous compounds						Assimilation of sugars						Proteolytic activity			Optimal temperature	Hydrolysis of the starch	Nomenclature of the strains
		Peptone	Asparagine	Urea	Potassium nitrate	Ammonium sulphate	Control	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Control	Inspissated serum	Milk	Gelatine			
I	261	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+	++	++	+	++	++	+++	37° C	+	**Madurella americana**
	879	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+	++	+++	+	++	+++	++	37° C	+	**Madurella Ikedae**
II	579	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	++	+++	+	++	+	—	+	+	30° C	+++	**Madurella grisea n. sp.**
	852	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	+	++	+	30° C	+++	**Madurella grisea n. sp.**
	853	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	±	+	+	30° C	+++	**Madurella grisea n. sp.**
	927	+++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	—	+	+	30° C	+++	**Madurella grisea n. sp.**
	1000	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	++	++	+	++	+	±	+	+	30° C	+++	**Madurella grisea n. sp.**
III	283	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	—	—	—	37° C	—	**Phialophora Jeanselmei**
	1072	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	—	—	—	37° C	—	**Phialophora Jeanselmei**
	1073	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	—	—	—	37° C	—	**Phialophora Jeanselmei**
IV	226	+++	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	—	—	—	37° C	—	**Clenospora Clapieri**
V	934	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++	++	+++	+	+	+	+	25° C	+++	**Monosporium scletoriale**

IMPORTANT NOTICE: The results of the influence of the sugars on the growth of the assayed strains are quoted "+" when the growth is identical as in the tube without any sugar (control). The signe "+" has a negative significance in this case. The same method was adopted to quote the action of the nitrogenous compounds. The reasons for such a conduct may be read in the text of this paper.

Einfluss von Vitaminen auf die Pilzkultur

von

A. St. v. MALLINCKRODT-HAUPT.
(*Aus der Universitäts-Hautklinik in Köln*)

Die nachstehenden Untersuchungen über den Einfluss von *Vitaminzusatz* zur Nährlösung auf *Wachstum, Pufferungsvermögen* und *Farbstoffbildung* verschiedener *Pilz*stämme aus der Gruppe der *Dermatophyten*, der *Hefen* und der *Actinomyceten* wurden von 3 Gesichtspunkten aus unternommen:

1) Sollte der direkte Einfluss der einzelnen Vitamine auf die Zelle selbst geprüft werden ohne Zwischenschaltung der beim Makroorganismus nicht vermeidbaren indirekten Wirkungen z.B. über das vegetativ-endokrine System.
2) Sollte versucht werden, auf dem Wege über eventuelle Differenzen im Vitaminenbedarf neue gruppenspezifische Merkmale für die Einordnung der einzelnen Pilzarten in ein biologisch unterbautes System zu bekommen.
3) Handelt es sich um Vorversuche für die Schaffung eines *optimalen Standartnährbodens für Pilze* mit chemisch bekannten Substanzen, der ohne Abhängigkeit von einer bestimmten Bezugsquelle — überall und jederzeit reproduzierbar ist.

Untersucht wurden 5 Stämme von eigentlichen Hautpilzen: *Achorion Schönleini, Achorion Quinckeanum, Trichophyton gypseum, Epidermophyton inguinale* und *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*; 2 Hefen: *Cryptococcus pararoseus* (Stamm U 46) und rote Lufthefe (Stamm 204) und aus der *Actinomyces*-Gruppe: *Streptotrix coelicolor* (Stamm 13) und *Nocardia lutea Khartum* (Stamm 15).

Methodik

Die Nährlösung enthielt 1% Asparagin als Stickstoff-, 3% Maltose als Kohlehydratquelle sowie die für die FINKsche Nährlösung angegebenen Salze — 0,05 % Calciumchlorid, 0,04% Magnesiumsulfat, 0,075% Monokaliumphosphat, 0,025% Dinatriumphosphat, 0,04% Calciumcarbonat.

Untersucht wurden von den wasserlöslichen Vitaminen: Vitamin C und aus der Vitamin B-Gruppe Vitamin B_1, Lactoflavin und Nikotinsäure, von den fettlöslichen Vitamin A und D. Die einzelnen Kolben enthielten je 40 ccm Nährflüssigkeit, denen — nach der Sterilisierung — die entsprechenden Vitaminmengen zugesetzt worden waren. Sie enthielten in den einzelnen Versuchsreihen pro Kolben:

1 ccm Cebion = 50 mg Vitamin C = (1000 i.E.)
1 ccm Betaxin = 2 mg Vitamin B_1 = (800 T.E.)
2 ccm Nikotinsäureamid = 100 mg Nikotinsäureamid
2 ccm Lactoflavin = 1,0 mg Lactoflavin = (250 R.E.)
0,5 ccm Vogan = Vitamin A = (60 000 i.E.)
0,5 ccm Vigantol = 0,15 mg Vitamin D_2 = (6000 i.E.)

Als Kontrolle diente für die wasserlöslichen Vitamine die oben genannte Nährlösung ohne Zusatz. Da Vigantol und Vogan Sesamöl als Lösungsmittel enthalten,

wurde zur Kontrolle der öllöslichen Vitamine ein Zusatz von 0,5 ccm Sesamöl zur Nährlösung verwendet.

Die Wachstumsstärke der einzelnen Stämme wurde mittels Wägung bestimmt. Die bewachsene Nährlösung wurde durch gehärtete Filter (nach SCHLEICHER und SCHÜLL) von feststehendem Gewicht filtriert, im Exsikkator über Chlorkalk bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann auf der Analysenwaage gewogen. Vor der Verarbeitung wurden Retrokulturen angelegt. Selbstverständlich kamen nur Reinkulturen zur Verarbeitung. Da das Wachstum in der gewählten Nährlösung durchschnittlich langsam war, betrug die Wachstumsdauer zur Erzielung genügenden Pilzmaterials 77 Tage für die Kulturen mit wasserlöslichen Vitaminen bez. 92 für diejenigen mit Zusatz von fettlöslichen Vitaminen.

Die Versuchsergebnisse waren folgende:

Wachstum

Die gute Verwertbarkeit des Asparagins und anderer Aminosäuren als Stickstoffquelle für Pilznährböden wurde bereits 1923 von F. BLUMENTHAL und mir an einer Reihe pathogener Hautpilzstämme festgestellt. WILLIAMS berichtet über gleichartige Ergebnisse. Für Strahlenpilze stellt es dagegen nach den Angaben LIESKES eine schlechte Stickstoffquelle dar. Bei den vorliegenden Untersuchungen war das Wachstum in Asparaginnährlösung nicht so gut wie bei Peptonzusatz, erreichte aber in allen Fällen genügende Stärke, um messbare Mengen Trockensubstanz zu erzielen.

Nachstehende Tabelle gibt die Durchschnittswerte für die einzelnen Pilzgruppen, sie schwanken zwischen 212—809 mg. Die Nikotinsäurekulturen waren sämtlich verunreinigt, sodass sie hier nicht Verwendung finden konnten und wiederholt werden müssen.

Tabelle I

	Wachstumsdauer in Tagen	Trockengewicht des Pilzrasens in mg.							Wachstumsdauer in Tagen
		Asparagin 1 % Maltose 3 %	+ C	+ B_1	+ B_2	+ Sesamöl	+ A	+ D	
Hautpilze	77	554	573	682	501	387	267	809	92
Hefen	77	349	248	344	709	248	326	742	92
Actinomyceten	77	358	312	325	566	212	234	424	92

Durchschnittswerte der einzelnen Pilzgruppen nach einer Wachstumdauer von 77 bzw. 92 Tagen, unter Zusatz verschiedener Vitamine zur Nährlösung.

Allgemein ergaben die eigentlichen *Hautpilze* in der gewählten Nährlösung das *stärkste Wachstum*, die Werte liegen ungefähr um die Hälfte höher als für Hefen und Actinomyceten, die untereinander etwa gleich starkes Wachstum zeigen. Ausserdem war der *Einfluss der verschiedenen Vitamine auf die einzelnen Pilzarten nicht der gleiche*: Bei den *Hautpilzen* erzielt der *Vitamin D-Zusatz* die *stärkste Wachstumssteigerung, an 2. Stelle*

steht Vitamin B_1, während das eigentliche „Wuchsvitamin" B_2 eher eine leichte Wachstumshemmung erkennen lässt. Schon der Zusatz von einigen Tropfen Sesamöl (dem Lösungsmittel des A und D-Vitamins) allein bewirkt deutliche Wachstumshemmung, die Steigerung durch Vitamin D in öliger Lösung ist also um so höher zu bewerten. Ganz ausgesprochen ist darüber hinaus die *wachstumshemmende Wirkung durch Vitamin A.*

Auch für *Hefen* steht die *wachstumssteigernde Wirkung* des *Vitamin D an erster Stelle, beinahe ebenso stark wirkt hier Vitamin B_2.* B_1-Zusatz lässt keinen deutlichen Einfluss erkennen, Vitamin C wirkt ausgesprochen hemmend. Unter Berücksichtigung der durch Sesamöl allein hervorgerufenen Hemmung wird durch Vitamin A eher eine geringe Wachstumssteigerung hervorgerufen.

Auch bei den *Actinomyceten* ist die *relative Wachstumssteigerung* (im Vergleich zur Hemmung durch Sesamöl) *bei Vitamin D am stärksten.* Den *absolut grössten Gewichtszusatz erzielt das Vitamin B_2.* Alle übrigen ergeben so geringe Ausschläge nach der einen oder anderen Richtung, dass sie kein sicheres Urteil erlauben.

Über die Werte im einzelnen geben die nachfolgenden beiden Tabellen. Aufschluss, die gleichzeitig die jeweiligen *pH-Werte der Nährlösung* — vor der Beimpfung und zum Schluss des Wachstums — enthalten, und damit den Hinweise für eine mögliche Fehlerquelle bei vergleichenden Vitaminuntersuchungen geben. Ausserdem ist die Wachstums*richtung* — an der Oberfläche oder in der Tiefe — angegeben.

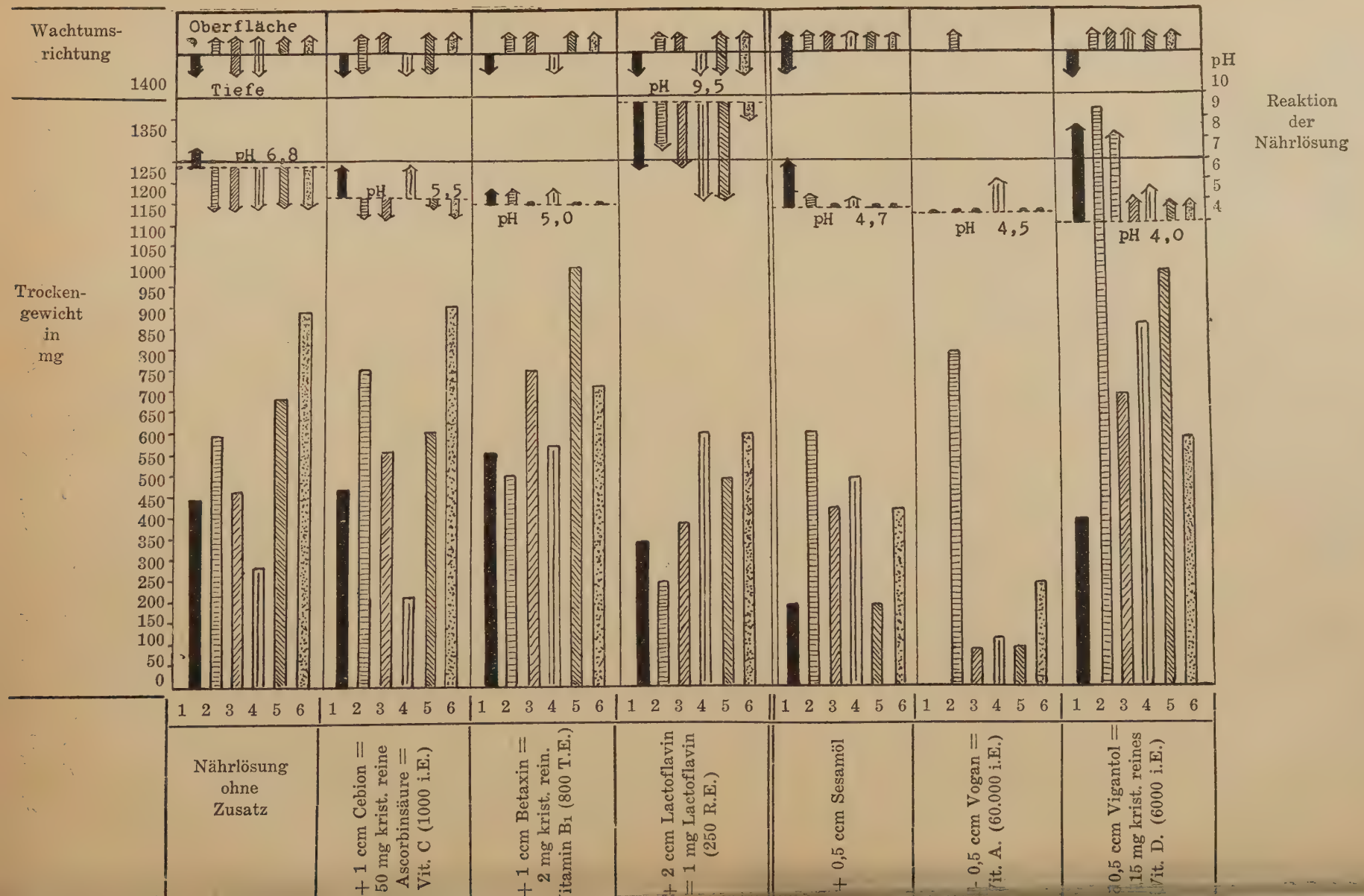
Was die Wachstumstendenz der verschiedenen *Hautpilzstämme* im einzelnen anbelangt, so stand an erster Stelle *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, an zweiter *Epidermophyton inguinale*, mittleres Wachstum ergaben *Achorion Quinckeanum* und *Trichophyton gypseum*, während *Achorion Schönleini* an vorletzter, *Microsporon depauperatum* an letzter Stelle stand. Sie zeigten also etwa das Verhalten, wie auf den üblichen Pilznährböden. Diese Gruppierung wird durch Zusatz der einzelnen Vitamine jeweils etwas verändert: Zusatz von Vitamin C ergibt für *Achorion Quinckeanum* und *Trichophyton gypseum* eine leichte Wachstumssteigerung, für die übrigen keine Veränderung oder sogar leichte Hemmung (*Microsporon depauperatum*). Bei Zusatz von B_1 war die erhöhte Wachstumstendenz ganz allgemein — mit Ausnahme von *Achorion Quinckeanum* — sehr deutlich feststellbar. Vitamin B_2-Zusatz bewirkte dagegen bei allen — mit Ausnahme von Mikrosporon depauperatum — eine ausgesprochene Wachstumshemmung.

Der Zusatz von Sesamöl als Kontrolle für die fettlöslichen Vitamine ergab trotz verlängerter Wachstumsdauer (um 15 Tage) geringere Gewichte mit Ausnahme von *Achorion Quinckeanum* und *Microsporon depauperatum*,

Tabelle II

Wachstumsstärke, Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und der Wachstumsrichtung in *Achorion-*, *Trichophyton-*, *Mikrosporon-* und *Epidermophyton*kulturen.

1 = *Achorion Schönleini*
2 = *Achorion Quinckeanum*
3 = *Trichophyton gypseum*
4 = *Mikrosporon depauperatum*
5 = *Epidermophyton inguinale*
6 = *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*


Wachtums-
richtung
Oberfläche
Tiefe
Trocken-
gewicht
in
mg
1400
1350
1250
1200
1150
1100
1050
1000
950
900
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pH 6,8
pH 5,5
pH 5,0
pH 9,5
pH 4,7
pH 4,5
pH 4,0
pH
10
9
8
7
6
5
4
Reaktion
der
Nährlösung
1 2 3 4 5 6
Nährlösung
ohne
Zusatz
+ 1 ccm Cebion =
50 mg krist. reine
Ascorbinsäure =
Vit. C (1000 i.E.)
+ 1 ccm Betaxin =
2 mg krist. rein.
itamin B1 (800 T.E.)
+ 2 ccm Lactoflavin
= 1 mg Lactoflavin
(250 R.E.)
+ 0,5 ccm Sesamöl
- 0,5 ccm Vogan =
Vit. A. (60.000 i.E.)
0,5 ccm Vigantol =
15 mg krist. reines
Vit. D. (6000 i.E.)

die eine geringfügige Gewichtsvermehrung zeigten, vielleicht im Zusammenhang mit der verlängerten Wachstumsdauer. Die Befunde bei den fettlöslichen Vitaminen können daher nur auf diese Werte bezogen werden.

Zusatz von Vitamin A ergab eine weitere deutliche Hemmung z.T. sogar Wachstumsstillstand mit einziger Ausnahme des *Achorion Quinckeanum* das höhere Werte als bei allen wasserlöslichen Vitaminen zeigte. Sonst ergab nur noch *Epidermophyton inguinale* positive Retrokultur, alle übrigen Retrokulturen zeigten kein Wachstum. Auch bei Vitamin D-Zusatz stand der Mäusefavus mit 980 mg an erster Stelle. Hier zeigten auch alle übrigen Pilzstämme wesentlich gesteigertes Wachstum nicht nur relativ zu der durch Sesamöl hervorgerufenen Hemmung, sondern grösstenteils auch absolut im Vergleich zu allen anderen Nährlösungen. In allen letztgenannten Kulturen kam es zur Bildung von zusammenhängenden Pilzrasen.

Weniger ausgesprochen waren die Wachstumsunterschiede bei den *Hefen* und *Actinomycesstämmen*, wie nachstehende Übersichtstabelle zeigt.

Das Wachstum in der Kontrollösung war bei allen Stämmen sehr gleichmässig und erreichte fast gleich hohe Werte. Weder der Zusatz von Vitamin C noch von Vitamin B_1 liess eine deutliche Wachstumsförderung erkennen. Dagegen wird hier die wachstumsfördernde Wirkung des Lactoflavins sehr deutlich. Von den Hefen erreicht *Cryptococcus pararoseus*, von den Actinomyceten *Nocardia lutea* Khartum mit 473 mg bzw. 867 mg die absolut höchsten Werte. Wie bei den Dermatophyten zeigte sich auch hier durch Zusatz von Sesamöl eine gewisse Wachstumshemmung, die durch Vitamin A-Zusatz z. Teil wieder aufgehoben wurde. Dagegen kam die wachstumssteigernde Wirkung des Vitamin D hier nicht so deutlich zum Ausdruck, wenn auch höhere Gewichte als in den Vitamin A-Kulturen erzielt wurden.

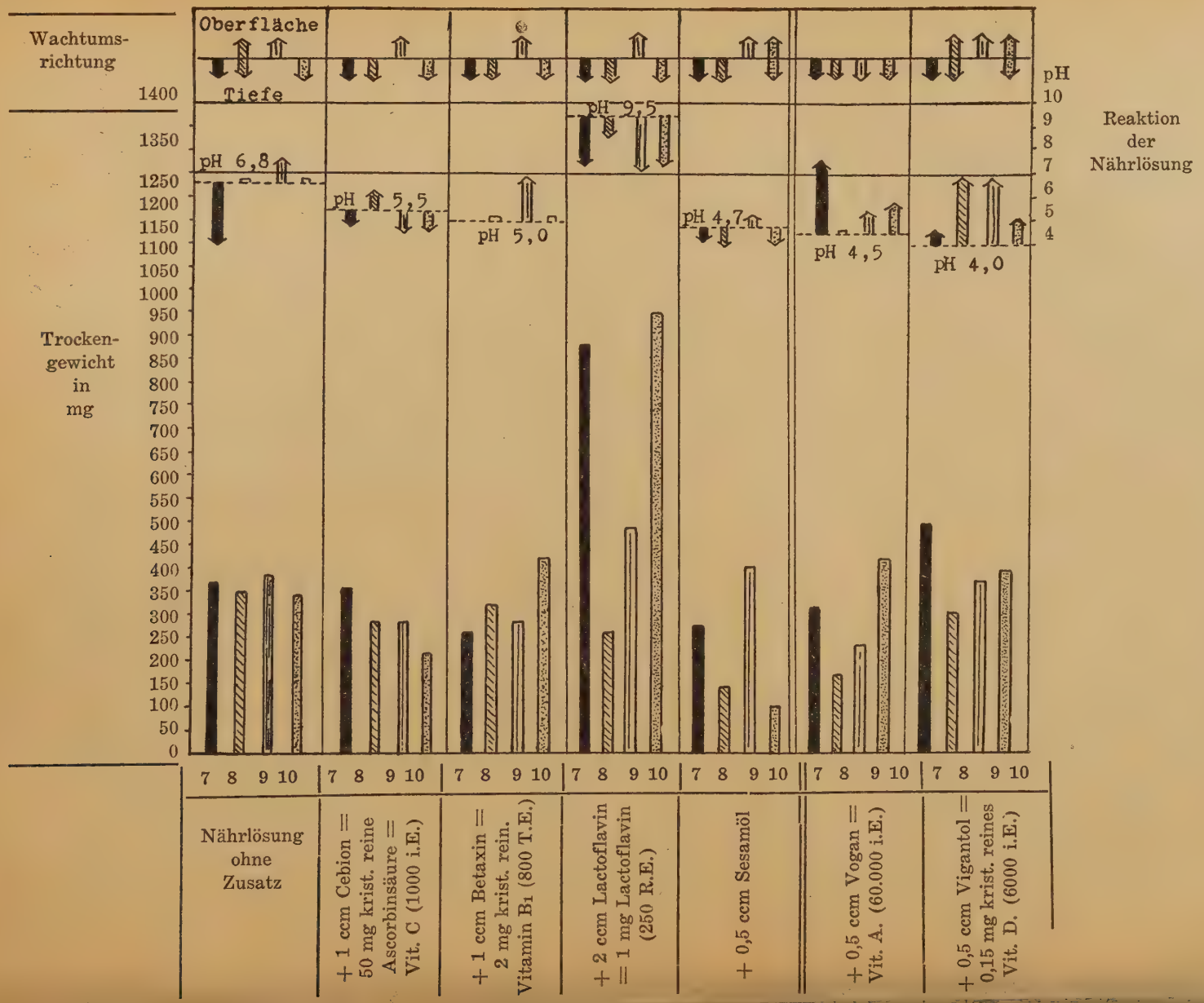
Natürlich kann man bei der relativ geringen Anzahl von Pilzstämmen noch kein entgültiges Urteil fällen, doch sprechen Paralleluntersuchungen an Bakterien und Kokken, über die ich an anderer Stelle berichten werde, im gleichen Sinne.

In der Literatur liegen bisher nur wenige Angaben über den Einfluss von Vitaminzusatz auf das Wachstum von Pilzkulturen vor, vor allem nicht mit chemisch reinen Lösungen. Ein Einfluss von Obst- und Gemüsesäften auf das Wachstum pathogener Hautpilze, *Actinomyces*, *Sporotrichum* und Hefen wurde von MANCA PASTORINO nicht gefunden, während AMALFITANO in seinen Versuchen mit *Monilia*- und *Cryptococcus*stämmen eine wachstumsbeschleunigende Wirkung durch Zusatz von Citronen- und Orangensaft feststellen konnte. Er nimmt an, dass es sich bei dem wachstumsfördernden thermostabilen Faktor um Vitamin D handelt. Im gleichen Sinne sprechen MANCA PASTORINOS Versuche mit Erdnussöl- und Sterogyl-

Tabelle III

Wachstumsstärke, Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und Wachstumsrichtung in Hefe- und Actinomyceskulturen.

7 = Cryptococcus pararoseus (Stamm U 46)
8 = rote Lufthefe (Stamm 204)
9 = *Streptotrix coelicolor* (Stamm 13)
10 = *Nocardia lutea Khartum* (Stamm 15)


Wachtums-
richtung
Oberfläche
Tiefe
1400
1350
1250
1200
1150
1100
1050
1000
950
900
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Trocken-
gewicht
in
mg
pH 6,8
pH 5,5
pH 5,0
pH 9,5
pH 4,7
pH 4,5
pH 4,0
pH
10
9
8
7
6
5
4
Reaktion
der
Nährlösung
7 8 9 10
Nährlösung
ohne
Zusatz
+ 1 ccm Cebion =
50 mg krist. reine
Ascorbinsäure =
Vit. C (1000 i.E.)
+ 1 ccm Betaxin =
2 mg krist. rein.
Vitamin B1 (800 T.E.)
+ 2 ccm Lactoflavin
= 1 mg Lactoflavin
(250 R.E.)
+ 0,5 ccm Sesamöl
+ 0,5 ccm Vogan =
Vit. A. (60.000 i.E.)
+ 0,5 ccm Vigantol =
0,15 mg krist. reines
Vit. D. (6000 i.E.)

zusatz (bestrahltes Ergosterin) — also mit Vitamin D-haltigen Produkten —, die nicht nur eine deutliche Wachstumsbeschleunigung, sondern auch ein vermehrtes Auftreten von Befruchtungsorganen und verstärkte Virulenz ergaben. Sie stimmen also mit unseren eigenen Befunden bezüglich der Wachstumsförderung durch Vigantol überein.

Die Wirkung des Vitamin B-Komplexes bei Zusatz zum SABOURAUD' schen Glukoseagar bzw. zum FRAENKEL'schen Nährmedium prüfte OYAMA an zahlreichen *Sporotrichum-* und *Trichophyton*arten, Hefen, *Actinomyces, Aspergillus* usw. und erzielte in den meisten Fällen eine deutliche Wachstumssteigerung. Welcher B-Faktor im einzelnen dabei ausschlaggebend war, lässt sich nicht entscheiden. Unsere vorliegenden Versuche sprechen für eine Wirkung des Lactoflavins. PINETTI fand durch Zusatz von Nicotinsäure zu *Trichophyton-* und *Microsporon*kulturen Gewichtssteigerungen bis zu 70% gegenüber den Kontrollen. In geringem Grade wirkte auch Vitamin B_1 wachstumfördend, besonders auf *Sporotrichum* und Hefen (OYAMA). Jedenfalls liegen auch diese Befunde in gleicher Richtung wie unsere eigenen.

WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION

Der Einfluss der Vitamine auf die aktuelle Reaktion der Nährlösung ist ein *zweifacher*: Einmal beeinflussen sie durch ihren Zusatz die *Anfangs-pH der Nährlösung in verschiedener Richtung* und können allein dadurch eine unspezifische Wachstumsförderung oder -Hemmung hervorrufen. Zweitens *verbessern sie* z.T. — wenigstens in synthetischer Nährlösung — *das „Pufferungsvermögen" der Pilze* und üben dadurch eine indirekte Wirkung auf die pH-Veränderungen der Nährlösung während des Pilzwachstums aus.

Die *Abhängigkeit des Pilzwachstums von der Wasserstoffionenkonzentration* der verwendeten Nährlösung ist bekannt. Die hier benützte Lösung zeigte eine pH von 6,8, was dem Wachstumsoptimum, wenigstens für Hautpilze, entspricht. Der Zusatz von Vitamin wirkt sich sehr verschieden aus: von den wasserlöslichen Vitaminen rufen *Vitamin C und* B_1 *starke Säuerung*, (pH 5,5 bzw. 5,0), *Vitamin* B_2 eine *intensive Alkalisierung* (pH 9,5) hervor. Der Zusatz von *Sesamöl* bewirkt *Säuerung* (4,7 pH), die durch *Vitamin A und D* noch verstärkt wird (4,5 bzw. 4,0). Wachstumsdifferenzen im Sinne einer Hemmung oder Förderung könnten also, abgesehen von jeder spezifischen Vitaminwirkung allein durch diese Unterschiede in der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung bedingt sein. Vergleichende Untersuchungen sollen daher in gepufferten Lösungen wiederholt werden. Es fragt sich nur, ob dann die eigentliche Vitaminwirkung, die ja auch vielfach an eine bestimmte aktuelle Reaktion gebunden ist, noch voll oder überhaupt zur Wirkung kommt. Dass die gefundenen Wachstums- und sonstigen Differenzen nicht nur auf das Konto günstiger oder ungünstiger Reaktion der Nährlösung zu setzen sind, geht schon daraus hervor, dass bei fast gleicher Anfangs-pH — 4,5 bzw. 4,0 — durch Vitamin A-Zusatz Wachstumshemmung, durch Vitamin D-Zusatz eine wesentliche Wachstumssteigerung hervorgerufen wurde.

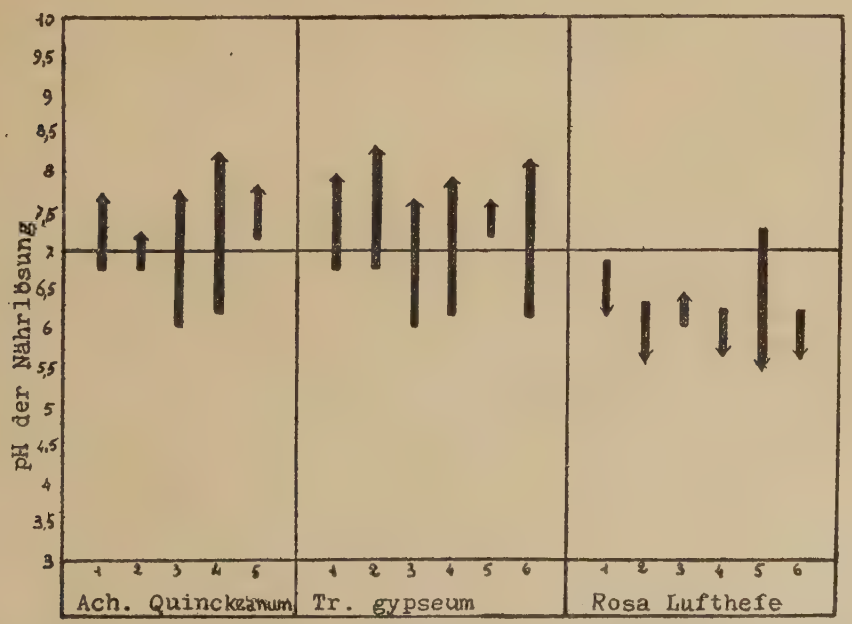
Durch die Arbeiten verschiedener Autoren (BILTRIS, BODIN, CERUTTI, FLARER, GUNDERSEN, KADISCH, KELLER, RIVALIER und BOUTELIER, TAKENOUCHI, TALICE, VAMOS) und meine eigenen steht fest, dass die pathogenen Hautpilze — nach den einzelnen Stämmen etwas verschieden — eine Wachs-

tumsbreite etwa zwischen pH 4,0—9,0 mit einem durchschnittlichen Wachstumsoptimum bei pH 6,8 haben. Für Actinomyceten sind die Wachstumsgrenzen etwa die gleichen (NÄSLUND und DERNBY) mit einem Optimum mehr im alkalischen Gebiet zwischen pH 7,0—8,0. Die Untersuchungen LIESKES ergaben weiter, dass sie — im Vergleich zu anderen Mikroorganismen — verhältnismässig empfindlich gegenüber Abweichungen nach der sauren wie nach der alkalischen Seite zu sind. Systematische Untersuchungen an Hefen liegen meines Wissens nicht vor, nur Einzeluntersuchungen (EULER und EMBERG). Es wäre demnach möglich, dass der verschieden starke Wachstumsreiz, den Lactoflavin auf Hautpilze einerseits, auf Actinomyceten und Hefen andererseits ausübt, zum Teil wenigstens auf die verschiedene grosse Alkaliempfindlichkeit der einzelnen Pilzarten zurückzuführen ist.

Die Abhängigkeit des Pilzwachstums von der aktuellen Reaktion der Nährlösung ist aber keine absolute. Auf den für gewöhnlich verwandten Nährmedien — mit Pepton als Stickstoffquelle — *sind die Pilze weitgehend im stande, die Reaktion der Nährlösung zu ändern und zwar, je nach der Pilzart, in verschiedener Richtung.* Eigene Untersuchungen an etwa 200 verschiedenen pathogenen Pilzstämmen in Pepton-Maltose-Nährlösung von einer Anfangs-pH von 6,8, hatten *charakteristische Unterschiede in der Alkali- bezw. Säurebildung innerhalb der einzelnen Pilzgruppen* ergeben. Die eigentlichen *Dermatophyten,* mit Ausnahme der Epidermophytonpilze, zeigten starke Tendenz zur *Alkalibildung,* während bei der

Tabelle IV

Alkali- bzw. Säurebildung durch Dermatophyten und Hefe in ungepufferter Nährlösung mit 1% Pepton und 3% Maltose.



Die Basis des Pfeils zeigt die Anfangsreaktion bei der Beimpfung, die Spitze die erreichte pH bei Wachstumsende an.

letztgenannten Gruppe sowie in noch ausgesprochenerem Masse bei den meisten *Hefen* die *Säurebildung* überwog. Die wenigen damals untersuchten Strahlenpilze verhielten sich unterschiedlich. Da die Untersuchungen seinerzeit unter ganz gleichen Ausgangsbedingungen vorgenommen wurden, müssen diesen physikalisch-chemischen Unterschieden Verschiedenheiten der Stoffwechselvorgänge zugrunde liegen. Nach TRUFFI und BENETAZZO ist die Erreichung eines gewissen Alkali- bezw. Säuregrenzwertes eine der Hauptursachen für den Wachstumsstilstand in der Kultur.

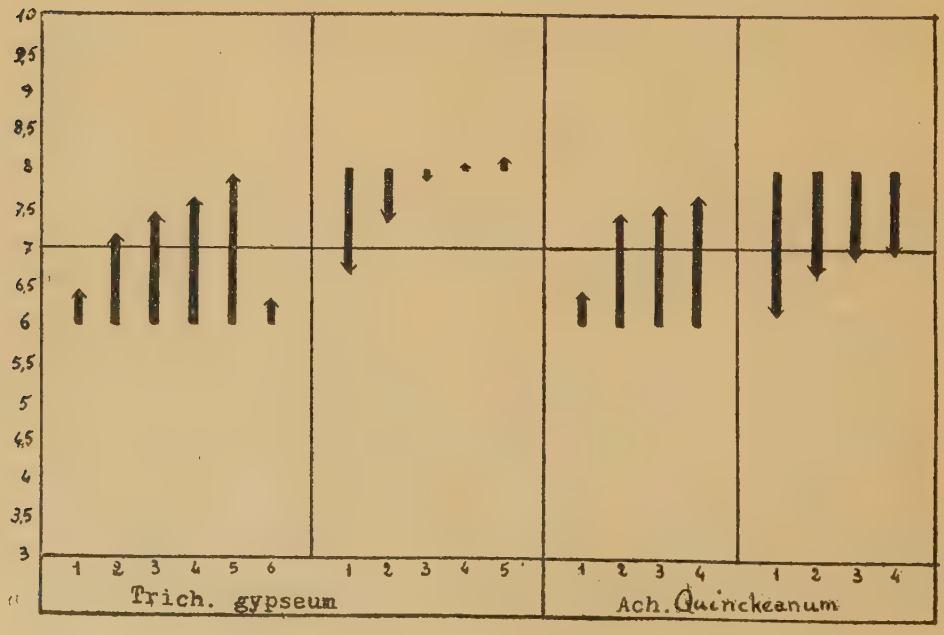
Nachstehende Tabelle (IV) zeigt das für die verschiedenen Pilzgruppen charakteristische Verhalten. Untersucht wurden damals je 5 Kulturen von *Achorion Quinckeanum*, 6 *Trichophyton gypseum*- und 6 Lufthefekulturen.

Von besonderer Wichtigkeit für den Daseinskampf der Pilze ist ferner die Tatsache, dass sie — wie die meisten Lebewesen — *gute „Pufferwirkung" besitzen*, d.h. *im stande sind, eine ihnen günstige Reaktion weitgehend festzuhalten und eine ihnen ungünstige Reaktion des umgebenden Milieus in einem ihnen günstigen Sinne auszugleichen.*

Benutzt man daher gepufferte Nährmedien mit stark saurer oder stark alkalischer Anfangsreaktion, so gelingt es dem Pilz nach einiger Zeit die *Pufferung zu durchbrechen* und die *Reaktion der Nährlösung im umgekehrten Sinne zu beeinflussen.* Erst später nach starkem Wachstum kommt die ursprüngliche für den Stamm charakteristische Reaktion wieder zum Vorschein. Als Beispiel diene nachfolgende Tabelle (V). Die Zahlen sind gleichfalls früheren Arbeiten entnommen.

Tabelle V

Alkali- bzw. Säurebildung durch Dermatophyten in gepufferter Nährlösung mit 1% Pepton und 3% Maltose bei einer Anfangs-pH von 6,0 bzw. 8,0.



Alle in saures Nährmedium eingeimpften Pilzstämme zeigten — je nach der Wachstumsstärke mehr oder minder starke Alkalibildung, während bei Benützung alkalischen Nährmediums Säurebildung einsetzte. Nur bei den beiden letzten „*Gypseum*"stämmen wurde Alkalibildung gefunden, weil die Untersuchung zu einem Zeitpunkt erfolgte, an dem bei stärkstem Wachstum über die ursprüngliche Säurebildung hinaus es schon wieder zu der für die *Trichophyton*pilze charakteristischen alkalischen Endreaktion gekommen war. Zu ähnlichen Resultaten kommen SCOLARI u.a.

Dieses bei zahlreichen Pilzen und Bakterien festgestellte „Pufferungsvermögen" ist — abgesehen von den jeweils charakteristischen Stoffwechselvorgängen — abhängig von Art und Menge der dargebotenen Nahrungsquellen. Worauf der Wirkungsmechanismus im einzelnen beruht, ist strittig, wahrscheinlich kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Aber gleichgültig, ob man Verschiedenheiten in der Säurebildung aus Zucker oder im Säureverzehr annimmt, wie sie von CHRAZSAEC und TINKOW, BUTKEWITSCH und FEDOROFF u.a. an Schimmelpilzen nachgewiesen wurden, oder Unterschiede in Art und Tiefe des Eiweissabbaus — Ammoniakausscheidung (ABT und LOISAU), Abhängigkeit vom Ammoniakstickstoffgehalt (DERNBY) usw. — jedenfalls bedeutet *Alkalibildung Überwiegen des Eiweiss — Säurebildung Überwiegen des Kohlehydratstoffwechsels.*

Genauere Untersuchungen an Hautpilzen, welche die Differenzen in der Alkalibildung bei Variation der Stickstoffquelle, aber auch den Einfluss der jeweils vorhandenen Kohlehydratstoffquelle erkennen lassen, liegen nur für *Trichophyton interdigitale* PRIESTLEY vor. GODDARD fand, dass Casein in Polypeptide, Aminosäuren und schliesslich Ammoniak aufgespalten wird. Das Vorhandensein von Pepton bewirkt zunächst eine Erhöhung, später eine Verminderung des Aminostickstoffs, gleichzeitig nimmt der Ammoniakgehalt unter Alkalisierung des Nährbodens zu. Die Anwesenheit von Glukose vermindert die Eiweissaufspaltung, aber nicht die Bildung von Ammoniak aus Aminosäuren. In Glukose-Pepton-Kulturen laufen Ammoniakstickstoffbildung und Dextroseverbrauch ungefähr parallel.

Auch die Alkalibildner unter den Pilzen zeigen nach meinen früheren Untersuchungen zunächst mehr oder minder starke Säurebildung und erst im Laufe des weiteren Wachstums treten wieder höhere pH-Werte auf.

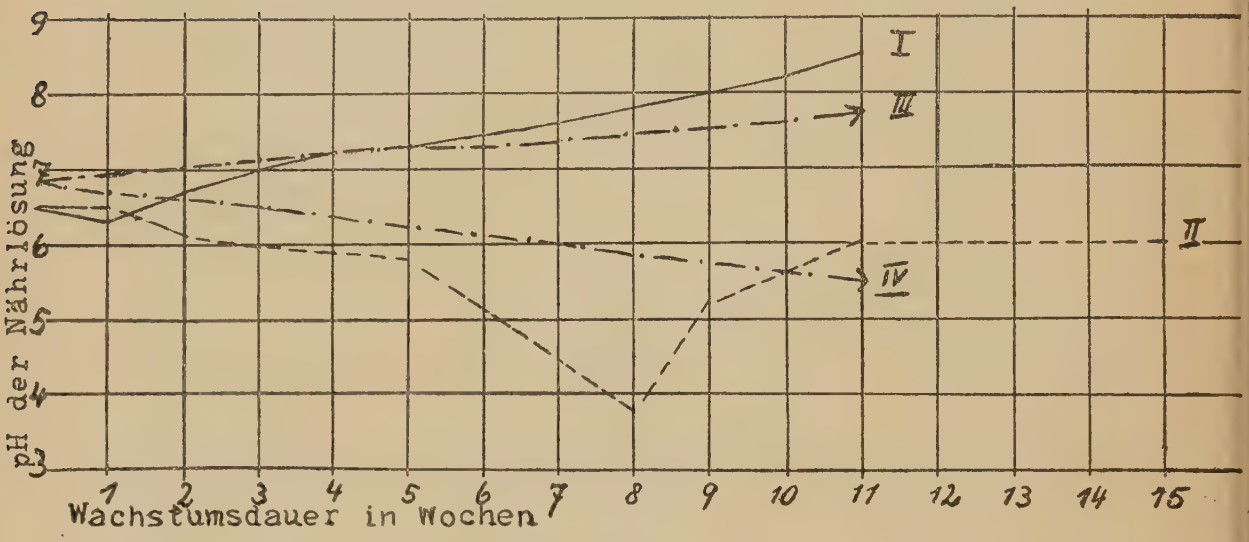
Es ist nun interessant festzustellen, dass die gewählte Nährlösung mit *Asparagin* als Stickstoffquelle und der dreifachen Menge Maltose als Kohlehydratquelle trotz ihrer optimalen Anfangsreaktion von pH 6,8 keinen idealen Pilznährboden darstellt, *da die Pilze in ihr zum grössten Teil nicht imstande sind, das ihnen genehme pH herzustellen. Die meisten Stämme zeigen Säurebildung, ohne den Umschlag ins Alkalische zu finden.* Eine Ausnahme bilden *Achorion Schönleini* und *Streptotrix coelicolor* die auch dann noch zur Alkalibildung befähigt sind. Auch die Tatsache, dass das Pufferungsvermögen der Pilze durch einen Wechsel der Stickstoffquelle beeinflusst wird, spricht für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen beiden Faktoren. Eine Säuerung der Nährlösung durch Vitaminzusatz muss sich in der gewählten Nährlösung also um so schwerwiegender auswirken, als den meisten Pilzstämmen hier Ausgleichsmöglichkeiten nicht gegeben sind und sie wie in gepufferten Lösungen wachsen, deren Pufferung sie nicht zu durchbrechen vermögen.

Als Beispiel seien zwei für die entsprechende Pilzgruppe typische Kurven (I u. II) wiedergegeben, die gleichfalls einer früheren Arbeit entnommen sind, und die Verhältnisse im Pepton-Maltose-Nährmedium dar-

stellen. Zum Vergleich dient das unterschiedliche Verhalten zwischen *Achorion Schönleini* (III) und den übrigen Hautpilzen (IV) in synthetischer Nährlösung.

Kurve

Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration während des Wachstums in Pepton-Maltose-Lösung.



I. ——— *Trichophyton acuminatum.*
II. — — — *Sporotrichtum de Beurmani.*
III. —.—.— Veränderung der Asparagin-Maltose-Nährlösung durch *Achorion Schönleini* in alkalischer Richtung.
IV. .—.— Veränderung der Asparagin-Maltose-Nährlösung durch die übrigen Hautpilze in saurer Richtung ohne Fähigkeit der Alkalibildung.

Unter Vitaminzusatz wird diese Tendenz zur Säurebildung nur wenig verändert. Bei Zusatz von Vitamin C und B_1 — die wohl hauptsächlich am Kohlehydratstoffwechsel angreifen — ergab die Nährlösung nach Beendigung des Wachstums kaum veränderte oder stärker saure Werte. Eine Ausnahme bildeten die *Vitamin D-Kulturen, die — trotz der am stärksten saueren Anfangsreaktion der Nährlösung — in allen Kulturen mehr oder minder gute Alkalibildung zeigen.* Vielleicht darf man daraus schliessen, dass der Angriffspunkt des D-Vitamins am Eiweisstoffwechsel der Pilze zu suchen ist. Wieweit dieser Umstand mit der besonders starken wachstumsfördernden Wirkung, insbesondere bei den Dermatophyten zusammenhängt, sollen weitere Untersuchungen in Pepton-Maltose-Nährlösung unter Vitaminzusatz klären. Auch *Vitamin A-Zusatz fördert* — soweit überhaupt Wachstum auftritt — *die Alkalisierung,* besonders bei den Hefen und Actinomyceten, wo es keine Wachstumshemmung hervorrief.

Der einzige stark alkalische Nährboden war die Vitamin-B_2 haltige Lösung. Hier zeigte sich bei allen Pilzstämmen gute Säuerung. Das Säurebildungsvermögen wird also offenbar durch die veränderte Stickstoffquelle

nicht beeinflusst. Ein Zusammenhang zwischen pH und jeweiliger Wachstumsrichtung war nicht zu erkennen.

Oberflächen- und Tiefenwachstum

Noch ein Wort über die Wachstums*richtung*, die als *Ausdruck eines verschiedenartigen Sauerstoffbedürfnisses* uns ebenfalls gewisse Einblicke in das Stoffwechselgeschehen erlaubt. Geht man von dem Verhalten der Pilze in der üblichen Pepton-Maltose-Lösung aus, so kann man 2 Gruppen unterscheiden: solche, die unter Luftmycelbildung mit Vorliebe an der Oberfläche der Nährlösung wachsen und andere, die unter überwiegend zelligem Wachstum die Tiefe aufsuchen, ohne Anaerobier im strengen Sinne zu sein. Von den hier untersuchten Pilzen gehören zur 1. Gruppe: von den Hautpilzen alle *Trichophyton-, Mikrosporon- und Epidermophyton*arten, von den Actinomyceten *Streptotrix coelicolor*. Zu der 2. Gruppe gehören: *Achorion Schönleini, Streptotrix lutea* Khartum und die beiden Hefen. Im vorliegenden Falle zeigte auch *Microsporon depauperatum* überwiegend Tiefenwachstum, was vielleicht mit seiner geringen Fähigkeit zur Mycelbildung in Zusammenhang steht.

Dass die Hautpilze mit sehr geringen Sauerstoffmengen auszukommen vermögen, ergaben frühere Versuche von BUSCHKE und BLUMENTHAL und mir (Berliner Dermat. Ges. 14.6.21), doch werden sie durch Sauerstoffmangel in ihrem Wachstum gehemmt (KADISCH). Unter streng anaeroben Bedingungen findet überhaupt kein Wachstum mehr statt (KADISCH). Auch für zahlreiche Strahlenpilzstämme ist ihre Anpassungsfähigkeit an veränderte Sauerstoffspannungen bekannt. Hier finden sich — besonders unter den pathogenen Stämmen — zahlreiche Anaerobier, die aber in vielen Fällen nach einigen Kulturpassagen auch bei Sauerstoffzufuhr zu wachsen vermögen. Dass auch Hefen — trotz ihres Gärvermögens und häufigen Tiefenwachstums — nicht völlig unabhängig von der Sauerstoffzufuhr sind, zeigten bereits die ersten Untersuchungen PASTEURS. Nach KADISCH besitzt besonders das von ihm untersuchte Oidum albicans ein erhebliches Sauerstoffbedürfnis.

Dass diesem *variablen Verhalten in der Wachstumsrichtung wirklich Änderungen im Atmungstypus zugrunde liegen*, zeigen z.B. die Arbeiten von F. F. NORD. Er konnte durch Eingriffe in den *Phosphorstoffwechsel* in Fusariumkulturen eine Umstellung von der alkoholischen Gärung zur Sauerstoffatmung willkürlich erzwingen. Gleichzeitig änderte sich das morphologische Wachstum: der Pilzrasen, der bisher aus einer vollständig benetzten Decke innerhalb der Nährlösung bestand, bildete nunmehr — bei Sauerstoffatmung — ein Mycel, dessen Fäden auf der Oberfläche wachsend, in die Luft hineinragten, nicht benetzbar waren und die Aufnahme des Sauerstoffs aus der Luft vermittelten. Für *pathogene Hautpilze* konnte WILLIAMS zeigen, dass Zusatz von *Phosphat* und *Lactat* zu Cystein-Dextrose-Nährboden zur Verminderung des Tiefen- und Steigerung des Oberflächenwachstums führt. Nach v. HAHN und JUNKER fördert ganz allgemein die Anwesenheit oberflächenaktiver Stoffe Mycelbildung und Oberflächenwachstum. Da frühere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen Oberflächenaktivität und Vitaminwirkung ergaben, kommt v. HAHN zu dem Schluss, dass die Mycelbildung der von ihm untersuchten Soorpilze als Vitaminwirkung aufzufassen sei.

In früheren Untersuchungen an den verschiedenartigsten Pilzen und Bakterien konnte ich zeigen, dass bei diesen Vorgängen auch der *Stickstoff-*

quelle eine besondere Bedeutung zukommt. Von den verwendeten Aminosäuren hat *Asparagin* eine ausgesprochene *Oberflächenwirkung,* in den meisten Kulturen wurde starkes Oberflächenwachstum mit Häutchenbildung beobachtet. Dagegen riefen *Cystein* und *Leuzin* eine ausgesprochene *Tendenz zum Tiefenwachstum* hervor. Die gleiche Tiefenwirkung auf pathogene Hautpilze fand WILLIAMS in festen Cysteinnährböden. Durch Zusatz von Methylenblau konnte er feststellen, dass wahrscheinlich oxydoreduktive Vorgänge dabei eine Rolle spielen.

Die hier vorliegenden *Vitamin*untersuchungen ergaben folgendes: von

Tabelle VI

Einfluss auf Farbstoffbildung, Fluoreszens u

	Asparagin 1 % Maltose 3 %		+ Vitamin C			+ Vitamin B_1		
	Farbe	pH	Farbe	Vitamingehalt nach Wachstum in γ	pH	Farbe	Vitamingehalt nach Wachstum	pH
Achorion Schönleini	farblos	2,5	gold-gelb	14	7,0	farblos	t 6,5	5,5
Achorion Quinckeanum	blassgelb	5,0	orange gold-gelb	20	4,5	gold-gelb	t 4,5	5,5
Trichophyton gypseum	gelb	5,0	gold-gelb	20	4,5	gelblich	t 0	5,0
Microsporon depauperatum	blassgelb	5,0	blass-gelb gold-gelb	20	7,0	gelblich	t 6	5,5
Epidermophyton inguinale	blass-gold-gelb	5,0	braun-gelb gold-gelb	16	4,8	gelblich	t 2,5	5,0
Epidermophyton Kaufmann-Wolf	gelb	5,0	orange gold-gelb	18	4,6	gelblich	t 5,5	5,0
Cryptococcus pararoseus	farblos	7,0	gold-gelb	14	4,8	farblos	t 4	7,0
Rosa Lufthefe	gelb-rosa	6,8	gold-gelb braun-gelb	4	4,8	gelb-rosa	t 3	5,0
Streptotrix coelicolor	gelb-grün purpur	4,5	purper violett farblos	28	5,0	gelb tint.-farb.	—	—
Streptotrix lutea Khartum	gelblich	6,8	goldgelb	18	6,5	gelb-rosa	t 6	5,0
Kontrolle unbewachsen	farblos	6,8	goldgelb hell-gelb		5,5	farblos	t 10	5,0

den untersuchten Pilzen liessen aus der Gruppe II *Achorion Schönleini* und *Cryptococcus pararoseus keine Änderung in der Wachstumrichtung* erkennen. Die übrigen Stämme zeigten sich variabler. Von den fettlöslichen Vitaminen scheint *Vitamin D Oberflächenwachstum, also Sauerstoffatmung zu fördern,* dagegen ergab *Vitamin A-Zusatz* — soweit überhaupt Wachstum auftrat — eine *ausgesprochene Begünstigung des Tiefenwachstums,* wie besonders die Hefe- und Actinomyceskulturen deutlich erkennen lassen. Von den wasserlöslichen Vitaminen liess entgegen unseren Erwartungen Vitamin B_1-, C- und B_2-Zusatz keinen besonderen Einfluss auf den At-

sserstoffionenkonzentration in der Nährlösung.

Lactoflavin			+ Sesamöl			+ Vitamin A			+ Vitamin D	
arbe	Fluoreszens	pH	Farbe	Fluoreszens	pH	Farbe	Fluoreszens	pH	Farbe	pH
lass-rün	blau-grün ++++	6,8	farblos	weissl. blau ++++	7,0	—	—	—	farblos	8,5
elb-rün	blau-grün ++++	7,5	gelb	blau +++	5,0	gold-gelb	gelb-grün ++	4,5	farblos	8,5
elb-rün	blau-grün ++++	7,3	gelblich	weissl. blau +++	4,5	farblos	weissl. blau +++	4,5	gold-gelb	5,0
elb-rün	gelb-grün ++++++	5,0	gelb	weissl. blau ++++	4,5	farblos	weissl. blau +++	4,5	gelblich	4,5
elb-h	blau +++	5,0	farblos	bläulich +	5,0	farblos	weissl. blau +++	6,0	gelblich	5,8
elb-rün	blau-grün ++++	9,8	gelblich	weiss-blau +++	4,5	farblos	weissl. blau +++	4,5	gold-gelb	4,5
elb-h	gelb-grün ++++++	7,0	weisslich	blau +	5,0	weisslich	weissl. blau +++	5,0	farblos	7,0
lass-rün	blau-grün ++++++	7,5	gelblich gold-gelb	blau +++	4,5	gelblich	weissl. blau +++	5,8	farblos	5,0
elb-rün	violett +	7,5	blau-viol. r. violett	schwarz-grün +	4,5	gelb	blau-viol. ++	7,5	blass-gelb gelb-rosa	4,5
elb-h	blau-grün ++++	8,5	gelblich	blau ++	4,5	farblos	weissl. blau +++	4,5	blass-gelb	7,0
elb-rün	blau-grün ++	7,5	farblos	blau ++	4,7	farblos	blau ++	4,5	farblos	4,0

mungstypus erkennen, obwohl doch gerade sie aufs engste mit oxydoreduktiven Vorgängen verknüpft sind. Es wäre allerdings möglich, dass in diesem Falle das Asparagin bereits in gleicher Richtung wirksam war, sodass eine weitere Steigerung der Wirkung durch Vitaminzusatz nicht mehr möglich ist.

Farbstoffbildung und Fluoreszens

Was die Farbstoffbildung anbelangt, so muss man unterscheiden zwischen der *für die einzelnen Pilzstämme charakteristischen Pigmentbildung* und etwaigen *in der Nährlösung während des Wachstums auftretenden fluoreszierenden oder nicht fluoreszierenden Farbstoffen*, welche entweder Umwandlungsprodukte der Vitamine selbst darstellen oder gewisse Anhaltspunkte für das Auftreten bestimmter Stoffwechselprodukte geben können.

Die Bildung farbiger oder fluoreszierender Stoffe durch Mikroorganismen ist weitgehend *abhängig von der Zusammensetzung der Nährlösung*. Für die pathogenen Hautpilze ist die *Anwesenheit von Sauerstoff* unbedingt erforderlich, bei verminderter Sauerstoffzufuhr trat keinerlei Farbstoffbildung auf. WILLIAMS betont die Bedeutung einer *überwiegenden Kohlehydratmenge im Verhältnis zur Stickstoffmenge*: bei pathogenen Pilzen war ein Verhältnis von Dextrose: Pepton von 4 : 1 am günstigsten für die Farbstoffbildung. Dies entspricht den für die Porphyrinbildung in der Kultur günstigsten Voraussetzungen; die dafür am geeignetste FINK'sche Nährlösung enthält Rohrzucker: Harnstoff im Verhältnis 10 : 1. In der gleichen Nährlösung gelang es mir gemeinsam mit CARRIÉ die Bildung der für Trichophyton- und Mikrosporonpilze charakteristischen fluoreszenzierenden Substanzen in grösseren Mengen in der Nährlösung zu erzielen.

Dass für die Farbstoffbildung auch die *Stickstoffquelle* nicht ohne Bedeutung ist, ergab sich als Nebenbefund bei systematischen Züchtungsversuchen pathogener Hautpilze in synthetischer Nährlösung unter Variation der Stickstoffquelle. Bei allen Versuchen fanden sich die roten und violetten leuchtenden Farbtöne nur in peptonhaltigen Kulturen, während mit Aminosäure oder anorganischen Stickstoffquellen schwach rosa, gelbliche oder bräunliche Farbtöne — auch bei sonst nicht farbstoffbildenden Stämmen — auftraten.

Unter den hier untersuchten Stämmen waren eigentliche *Farbstoffbildner* die beiden Hefen und Actinomyceten, unter den pathogenen Hautpilzen fehlten die farbstoffbildenden Arten. Während *Cryptococcus pararoseus* rosafarbene, die Lufthefe und *Nocardia lutea* Khartum intensiv ziegelrot gefärbte Kulturen bildeten, deren Farbstoffe kaum oder gar nicht in die Nährlösung übergehen (chromophore Stämme), bildet *Streptococcus coelicolor* einen in den Nährboden übergehenden weinroten Farbstoff (chromopare Form).

Die als Kontrolle dienende Asparagin-Maltose-Nährlösung war ursprünglich farblos und wurde von der Mehrzahl der Pilzstämme leicht gelblich verfärbt. Die chromopare Farbstoffbildung war gering. Rote Lufthefe zeigte geringgradige Gelbrosafärbung, ein geringer Teil des Farbstoffs scheint also in die Nährflüssigkeit überzugehen, wenn er nicht aus abgestorbenen und aufgelösten Pilzzellen stammt. In der *Streptotrix coelicolor*-Kultur verfärbte sich die Flüssigkeit im Laufe des Wachstums grüngelb,

dann purpurfarben, möglicherweise im Zusammenhang mit pH-Veränderungen in der Kultur. Wissen wir doch, dass der von einer Reihe von Actinomycesstämmen gebildete weinrote Farbstoff bei Zusatz von verdünnter Salzsäure in Gelb, bei Zusatz von Kalilauge in Violett umschlägt. (LIESKE).

Der Einfluss der Vitamine war ein sehr unterschiedlicher. Durch Zusatz von *Ascorbinsäure* wurde die Farbe der Nährlösung goldgelb und nahm bei den einzelnen Pilzkulturen die verschiedensten Schattierungen von hellgelb über goldgelb bis orange und braungelb an, was auf lebhafte Oxydo-Reduktionsvorgänge schliessen lässt. Auffallend war, dass in der *Trichophyton-gypseum*-Kultur diese Braunfärbung direkt unter dem Pilzrassen im oberen Drittel der Nährlösung auftrat und von oben nach unten fortschritt, also offenbar abhängig vom Zutritt des Luftsauerstoffes war. Die gleiche Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr betont LIESKE für die Bildung von braunem Farbstoff durch Actinomyceten. In der *Streptotrix coelicolor*-Kultur trat anfangs Purpur-, später Violettfärbung auf. Die rote Lufthefe zeigte Rosafärbung, *Streptotrix lutea* Khartum Ziegelrotfärbung. *Die Farbstoffbildung wird also durch Vitamin C-Zusatz begünstigt.*

Nach Abschluss des Wachstums wurde der Vitamin C-Verbrauch in der Kultur unter Verwendung der von MERCK hergestellten Dichlorphenolindophenoltabletten (1 Tabl. = 1 mg Ascorbinsäure) gemessen. Von den ursprünglich vorhanden gewesenen 50 mg waren nur noch ganz geringe Mengen zwischen 14—28 γ, in einem Fall (Lufthefe) nur noch 4 γ nachweisbar. Bei der grossen Labilität des Vitamin C in wässeriger Lösung, die noch dazu dem Tageslicht ausgesetzt war, dürfte ein grosser Teil davon nicht durch die Pilze verbraucht, sondern zerstört worden sein. Immerhin ist es auffallend, dass noch wochenlang Farbveränderungen im Nährboden auftraten, die in den anderen Versuchsreihen nicht beobachtet wurden, also nur durch die Ascorbinsäure bedingt sein konnten. Es ist anzunehmen, dass sie in der Nährlösung — ähnlich wie auch sonst in der Natur z.B. im Saft der Zitrone — in eine haltbarere Form überführt wurde.

Den *stärksten Einfluss auf die Farbstoffbildung im positiven Sinne übt das Vitamin B_1 aus.* Die Lufthefe zeigte starke Rosafärbung, Streptotrix lutea Khartum intensive Ziegelrotfärbung wie in Peptonkulturen. Bei beiden ging der Farbstoff in die Nährlösung über, die gelbrosa verfärbt war. Die Färbung in der *Streptotrix coelicolor*-Kultur war die einer dunkelvioletten Tinte und vollkommen undurchsichtig. Dies steht in Parallele zu meinen früheren Untersuchungen, nach denen auch die Porphyrinbildung in der Kultur durch Vitamin B_1 wesentlich verstärkt wird.

Der Vitamin B_1-Gehalt in der Kultur wurde nach Beendigung des Wachstums durch Extraction mit Isobutylalkohol und Ablesung der Fluoreszensstärke bestimmt. Die angegebenen Zahlen stellen keine absoluten Werte, sondern nur Vergleichszahlen dar. Den stärksten Verbrauch zeigte *Trichophyton gypseum*, in dessen Kulturflüssigkeit kein B_1-Vitamin mehr nachweisbar war. Der B_1-Verbrauch ging weder mit der Wachstumsstärke noch mit Sauerstoffbedürfnis, Änderung der Wasserstoffionenkonzentration oder Farbstoffbildung parallel.

Im Gegensatz zu diesen positiven Befunden wurde durch *Lactoflavin jede Farbstoffbildung gehemmt.* Der Vitaminverbrauch war in allen Kulturen nur gering, wie sich durch Fluoreszensbestimmung direkt in der Kulturflüssigkeit ohne weiteres nachweisen liess. Es zeigte sich mehr oder minder starke charakteristische Blaufluoreszens. Nur bei *Microsporon de-*

pauperatum und *Cryptococcus pararoseus* trat sehr starke Gelbgrün-Fluoreszens auf, was für eine Umwandlung in Lumiflavin spricht.

Auch die fettlöslichen *Vitamine A und D* zeigten sich *stark hemmend auf die Farbstoffbildung* während bei Zusatz von Sesamöl allein bei *Actinomyces lutea* Khartum Rosafärbung des Pilzrasens auftrat.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Überblickt man die hier vorliegenden Versuchsergebnisse, so kann man folgendes sagen:

Der Zusatz von *Vitamin*lösungen zu Pilzkulturen zeigt einen *deutlichen Einfluss* auf *Wachstumsstärke, Pufferungsvermögen* und *Farbstoffbildung.* Er ruft ausserdem starke Differenzen in der aktuellen Reaktion der Nährlösung hervor im Sinne einer Säuerung (Vitamin A, D, C, B_1) oder Alkalisierung (B_2), die bereits auf diesem unspezifischen Wege eine Erklärung für die gefundenen Unterschiede geben könnten. Darüber hinaus kommt jedoch eine spezifische Wirkung der einzelnen Vitamine sicher zur Geltung, da z.B. Vitamin A und D, die beide eine fast gleich starke Säuerung der Nährlösung hervorrufen (pH 4,5 bezw. 4,0) in genau entgegengesetztem Sinne auf das Wachstum einwirken.

Vitamin A wirkt ausgesprochen *wachstumshemmend* auf die eigentlichen *Hautpilze,* während bei Hefen und Actinomyceten diese Wirkung nicht deutlich erkennbar ist. Die Wachstumsrichtung beeinflusst es im Sinne einer *Begünstigung des Tiefenwachstums,* also im Sinne eines *geringeren Sauerstoffbedürfnisses.* Die *Fähigkeit der Pilze,* die stark saure Reaktion der Nährlösung zu *alkalisieren, ist gering. Farbstoffbildung* wird *gehemmt.* Ob hier ein Zusammenhang besteht mit den Befunden von MU, FRAZIER und PILLET, die bei Vitamin A-Mangel Pigmentvermehrung in der Epidermis fanden, müssen erst weitere Untersuchungen ergeben.

Die ausgesprochen wachstumshemmende Wirkung des Vitamin A auf pathogene Hautpilze gibt seiner ursprünglichen Bezeichnung als „antiinfektiöses" Vitamin eine neue Berechtigung. Heute ist man der Auffassung dass die antiinfektiöse Wirkung in erster Linie auf seine Fähigkeit, vor Epithelschädigungen zu schützen beruht und bevorzugt die Bezeichnung „Epithelschutzvitamin". Sein Verhalten in der Pilzkultur lässt jedenfalls erkennen, *das zum mindesten ein Teil seiner Wirkung auf einer Hemmung bestimmter Krankheitserreger beruhen kann.* Daneben käme — speziell bei Infektionen der Haut — eine weitere indirekte Wirkung in Frage, da Vitamin A-Mangel eine Unterfunktion der Schweissdrüsen bedingt und da- (pH 5,5) grösstenteils nicht ausgleichen, sondern zeigen weiter Säurebildung. Oberflächen- und Tiefenwachstum sind gegenüber den Kontrollen unverändert. Günstig ist der Einfluss gegenüber der *Farbstoffbildung,* die deutlich *gefördert* wird. Dies widerspricht der klinischen Erfahrung, wonach pathologische Pigmentierungen durch grosse Vitamin C-Dosen unter Umständen zum Verschwinden gebracht werden können, sowie den experimentellen Befunden von v. SZENT-GYÖRGYI und von SCHROEDER, die zeigen konnten, dass die Ascorbinsäure in vitro die Bildung von Melanin hemmt bzw. dass die Wirkung von Dioxyphenylalanin auf die pigmentbildende Epidermiszelle durch Vitamin C-Zusatz gehemmt wird.

Überhaupt ist ja der Einfluss der Ascorbinsäure auf die Melanogenese und der Angriffspunkt seiner Wirkung noch umstritten. (CAPELLI, JADASSOHN und SCHAAF, VERSARI, TENCH-IO, SCHROEDER und EINHAUSER u.a.) Darüber hinaus traten in allen Kulturen gelbgrün- bis braun gefärbte Stoff-

wechselprodukte in den verschiedensten Schattierungen in der Nährlösung auf, die auf eine besondere Einwirkung des C-Vitamins in seiner Eigenschaft als Redoxpotential schliessen lassen. Vielleicht kann man hier auch an photochemische Prozesse denken, in Parallele zu seiner wahrscheinlichen Beteiligung an der Photosynthese der grünen Pflanzen (BUKATSCH).

Aus den wochenlang anhaltenden Farbumschlägen in der Nährlösung darf man schliessen, dass die Ascorbinsäure in der Nährlösung nicht so rasch zerstört wird, wie man im allgemeinen annimmt. Wahrscheinlich kommt ihr das mangelnde Alkalisierungsvermögen der Pilze zu gute, da sie in saurer Lösung wesentlich haltbarer ist, als in alkalischer oder neutraler, in der sie rasch oxydiert wird. Oder es erfolgt ihre Überführung in sogenanntes Ascorbinogen, eine beständige Form, in der sie zu etwa 70% in der Pflanze vorkommen soll (GUHA). Jedenfalls liessen sich auch nach wochenlangem Wachstum noch kleine Mengen C-Vitamin in der Kulturflüssigkeit nachweisen.

Von der Vitamin B-Gruppe wurde nur *Vitamin* B_1 (Aneurin) und aus dem B_2-Komplex das *Lactoflavin* untersucht.

Das *Vitamin* B_1 ergab nur bei den eigentlichen *Dermatophyten* eine deutliche *Wachstumssteigerung,* während das als „Wachstumsvitamin" bezeichnete Lactoflavin bei ihnen keine Wirkung erkennen liess. Dass der B_1-Bedarf der einzelnen Mikroorganismen sehr verschieden ist, ist bekannt. Es gibt Stämme, z.B. bestimmte Mucorarten, die selbst zur Vitamin B_1-Synthese nicht befähigt sind und für ihr Wachstum unbedingt auf Aneurin-haltige Nährmedien angewiesen sind (TATUM, KNIGHT, SCHOPFER). Bestimmte Schimmedpilzarten reagieren so fein auf Zusatz ganz geringer Mengen von Vitamin B_1, dass der sog. „Phykomycestest" (SCHOPFER-JUNG, MEIKLEJOHN, MORELL) zur Aneurinbestimmung im Blut Verwendung finden kann. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen in dem Sinne, dass die pathogenen Hautpilze nicht zu B_1-Synthese befähigt und daher durch B_1-Zusatz in ihrem Wachstum gefördert werden.

Das *Alkalisierungsvermögen* der Pilze wird durch B_1-Zusatz *verbessert,* wenn die erreichten pH-Werte auch noch nicht der Norm entsprechen. Worauf diese Wirkung beruht, ist noch unklar. Angriffspunkt seines Wirkungsmechanismus ist der Kohlehydratstoffwechsel und zwar ist das Aneurin am Abbau der a-Ketosäuren, besonders der Brenztraubensäure sowie am Milchsäureabbau beteiligt. Vielleicht kommt es auf diesem Wege zu einer Säureverminderung in den Kulturen.

Ein Einfluss auf Oberflächen- oder Tiefenwachstum war nicht festzustellen, trotzdem bekannt ist, dass Vitamin B_1 die Gewebsatmung im Sinne durch eine Herabsetzung des „Säuremantels" der Haut (MARCHIONINI). Damit sind dann — wenigstens für die Dermatophyten, die ein noch schwach saures bis neutrales Milieu bevorzugen — bessere Haftbedingungen gegeben. Im gleichen Sinne kann man die verminderte Resistenz bei A-Mangel-Tieren gegenüber Pilzinfektionen deuten, die JOYEUX und SAUTET am Meerschweinchen, ich selbst an weissen Ratten (noch unveröffentlicht) nachweisen konnten.

Vitamin D, das gleichfalls in Sesamöl gelöst, also unter gleichen Bedingungen zur Einwirkung kam, wirkt auf alle Pilzgruppen stark *wachstumsfördernd,* besonders wenn man die hemmende Wirkung des Lösungsmittels in Rechnung setzt. Trotz stark saurer Anfangsreaktion gewinnen die Pilze durch seine Anwesenheit die Fähigkeit, in stärkerem Masse als in den übrigen Versuchsreihen, die Nährlösung zu *alkalisieren.* Ausserdem

besteht Neigung zum *Oberflächenwachstum*, also *erhöhter Sauerstoffbedarf*. Letztere Eigenschaften sind z.T. bereits durch das Lösungsmittel bedingt, kommen aber in den Vitamin D-Kulturen wesentlich stärker zum Ausdruck als in den Sesamölkölbchen. Vitamin D verhält sich also in vieler Beziehung *antagonistisch* zum *Vitamin A*. Gemeinsam ist beiden die hemmende Wirkung auf die Farbstoffbildung, ausserdem die *Förderung der Alkalibildung, welche eine wesentliche Teilkomponente der Anpassungsfähigkeit der Pilze an ein ihnen nicht adaequates Milieu darstellt.*

Das im Vigantol enthaltene Vitamin ist D_2, also qualitativ das gleiche, das durch Photosynthese in der Haut entsteht. Die Steigerung des Abwehrvermögens besonders gegenüber Eiterinfektionen durch Vitamin D (TAKENOUTI) kann also nicht in einer direkten Einwirkung des D-Vitamins auf den angreifenden Mikroorganismus zu suchen sein.

Besonders interessant ist die auffallende Hemmung der Farbstoffbildung im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der *Pigmentbildung in der menschlichen Haut*. Sie spricht vollständig gegen die Vermutung KOCSARDS, dass die Dopaoxydase mit dem Vitamin D identisch sei. Vielmehr taucht hier die Frage auf, ob nicht das gleichzeitig unter UV-Lichteinwirkung gebildete Hautpigment durch das an Ort und Stelle entstehende Vitamin D in seiner weiteren Vermehrung gehemmt wird und so einem ausgleichenden Regulationsmechanismus unterliegt. Über Versuche in dieser Richtung, die ja nicht zum vorliegenden Thema gehören, wird an anderer Stelle berichtet.

Von den wasserlöslichen Vitaminen interessiert besonders das *Vitamin C*, das nach neueren Untersuchungen in ziemlich reichlichen Mengen in der Haut und zwar in der Epidermis nachgewiesen wurde, (GIROUD und MITARBEITER) was nicht als Ausdruck einer Speicherung sondern einer besonderen funktionellen Leistung zu bewerten ist.

In den vorliegenden Versuchen zeigte die *Ascorbinsäure keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum*, sie wird im allgemeinen ja auch nicht zu den Wuchsstoffen gerechnet. Doch war auch keine Wachstumshemmung zu beobachten, die ihr zugeschriebene Erhöhung der Widerstandskraft gegenüber pyogenen Infektionen (TAKENOUTI) scheint also nicht auf einem direkten Angriff gegen den jeweils in Frage kommenden Mikroorganismus zu beruhen. Auch die Fähigkeit zur Alkalibildung wird nicht verbessert, was wir eigentlich erwartet hatten, da das C-Vitamin als Aktivator des Eiweisstoffwechsels gilt und selbst die Eigenschaft einer Aminosäure-Oxydodesamidase besitzt. Offenbar überwiegt ihr Einfluss auf den Kohlehydratstoffwechsel, an dem sie als Dehydrase durch Wasserstoffabspaltung und Glykolyse beteiligt ist. Die Pilze können die saure Anfangsreaktion einer verstärkten Sauerstoffaufnahme aktiviert. Der Einfluss auf die *Farbstoffbildung* war ein *ausserordentlich günstiger*.

Das Lactoflavin gilt als eigentlicher Wuchsfaktor. Entsprechend wirkte es auf Hefen und Actinomyceten ausgesprochen *wachstumssteigernd*, während auf die Wachstumsstärke der pathogenen Hautpilze kein sicherer Einfluss feststellbar war. Da Lactoflavin aber die einzige Substanz ist, die zu einer starken Alkalisierung der Nährlösung führte und somit eine Vergleichsmöglichkeit fehlt, bleibt die Frage offen, wie weit die unspezifische Alkaliwirkung eine der Wirkungskomponenten bildet. Hier sollen noch weitere Versuche mit gepufferten Lösungen zur Klärung herangezogen werden. Die Wachstumswirkung soll im wesentlichen darauf beruhen, dass es als Baustein des „gelben Fermentes" (WARBURG-CHRISTIAN) zum Zustande-

kommen der energieliefernden Oxydationsvorgänge in der Zelle unentbehrlich ist. In dieser Form übt es auch einen Einfluss auf die Zwischenprodukte des Zuckerstoffwechsels aus. Darüber hinaus ist das Lactoflavin im Organismus in sehr verschiedenartiger Bindungsform verankert und zwar bildet es in der Hauptsache lockere Eiweissverbindungen. Entsprechend greift es — im Gegensatz zum B_1 — in die verschiedenartigsten Teilprozesse des Eiweisstoffwechsels ein, z.B. in den oxydativen Abbau der Aminosäuren und Purinbasen. Ob es auf diesem Wege einen Einfluss auf das Alkalisierungsvermögen der Pilze auszuüben vermag, war ebenfalls wegen der von vornherein stark alkalischen Reaktion der Nährlösung nicht zu entscheiden. Zum Ausgleich dieser stark alkalischen Anfangsreaktion fand in allen B_2-Kulturen *gute Säurebildung* statt. *Die Störung im Pufferungsvermögen der Pilze bei Asparagin als Stickstoffquelle beschränkt sich also offenbar auf eine isolierte Verminderung der Alkalibildung, während die Fähigkeit der Säurebildung unverändert erhalten ist.*

Ein besonderer Einfluss auf Oberflächen- oder Tiefenwachstum war nicht feststellbar, obwohl gerade das Lactoflavin einen spezifisch aktivierenden Einfluss auf die Zellatmung — allerdings nur auf deren blausäureunempfindlichen Anteil — ausübt.

Auf die *Farbstoffbildung* der Pilze wurde ein *hemmender Einfluss* ausgeübt. Die Untersuchung der Fluoreszens in der bewachsenen Nährlösung ergab z. Teil eine wahrscheinliche Umwandlung — durch das Licht oder durch die Einwirkung der Pilze — in Stoffe ohne Vitaminwirksamkeit, nämlich in das in alkalischer Lösung gelbgrün fluoreszierende *Lumiflavin* bzw. das in neutraler oder saurer Lösung blau fluoreszierende *Lumichrom.*

Ausser diesen allgemein biologisch interessanten Tatsachen ergeben die vorliegenden Versuche *gruppenspezifische Unterschiede,* die auf Verschiedenheiten im Stoffwechsel hinweisen: so die fördernde Wirkung des Wachstums der Dermatophyten durch Vitamin B_1, der Hefen und Actinomyceten durch Vitamin B_2. Oder die Tatsache, dass innerhalb der Hautpilzgruppe das Achorion Schönleini sich bezüglich des Pufferungsvermögens anders verhielt als die übrigen Stämme, was für Besonderheiten in seinem Eiweissstoffwechsel spricht.

Unterschiede unter den einzelnen Pilz- und Bakterienarten bezüglich ihres Vitaminverbrauchs, ihres Vitaminbedarfs und damit in engstem Zusammenhang ihrer Vitaminsynthese sind bekannt. Wir wissen — wie schon erwähnt — dass bestimmte Mucorarten nicht zur Vitamin B_1-Synthese befähigt sind und nur in Vitamin B_1-haltigen Nährmedien zu wachsen vermögen während andere, z.B. Hefen, fast alle Faktoren des Vitamin B-Komplexes enthalten.

Unter den vorliegenden Bedingungen — also bei Verwendung synthetischer Nährlösung — liess sich bei keinem der untersuchten Pilzstämme Vitamin B_1 in der Kultur nachweisen. Bei der grossen Alkaliempfindlichkeit des Aneurins ist eine Synthese durch pathogene Hautpilze von vornherein unwahrscheinlich, da diese durchweg Alkalibildner sind.

Auch für die Zusammensetzung eines *Pilz-Standart-Nährbodens* ergaben sich Richtlinien, die — wenigstens für die Hautpilze — einen Zusatz von Vitamin C, B_1 und D zu einem Nährmedium chemisch bekannter Zusammensetzung zweckmässig erscheinen lassen. Da es sich hierbei aber nicht nur um eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit, sondern in erster Linie um die Erzielung eines charakteristischen morphologischen

Aussehens der Makrokultur bzw. der Bildung charakteristischer Fruktifikationsorgane handelt, werden z.Z. weitere vergleichende Reihenuntersuchungen auf festen Pilznährböden von chemisch bekannter Zusammensetzung unter gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle durchgeführt.

Zusammenfassung

Untersucht wurde die Wirkung von Vitaminsusatz auf Pilzkulturen in chemisch bekannter Nährlösung. Zur Verwendung kamen Dermatophyten, Hefen und Actinomycesstämme. Von den wasserlöslichen Vitaminen wurden Aneurin, Lactoflavin und Ascorbinsäure, von den fettlöslichen Vitamin A und D untersucht. Es ergab sich — je nach Vitamin und Pilzart verschieden — ein Einfluss auf Wachstumsstärke, Wachtumsrichtung, Pufferungsvermögen und Farbstoffbildung in fördernden oder hemmenden Sinne. Auf die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung allein durch die stark veränderte Nährbodenreaktion in saurer oder alkalischer Richtung wird besonders hingewiesen.

Summary

It had been examined the effect of added vitamins added to cultures of fungi growing in a chemically known medium. The fungi were dermatophytes, yeasts, and actinomyces. The added vitamins were aneurin, lactoflavin, and ascorbin acid of the vitamins solvable in water and vitamin A and D of the vitamin solvable in adipose. It had been found an effect on the extent and direction of growing, on the ability of keeping u pthe concentration of hydrogen ions, and the production of pigment. The effect was on one hand advancing, on the other reducing. It is pointed out the possibility of a not especial effect coursed only by the extremely changed reaction of the culture medium being changed in alkaline and acid direktion.

Literatur-Verzeichnis

1) Abt und Loisau: zit. nach Sierakowski: Biochem. Z. 151, 1924.
2) Amalfitano: Riforma med. 1935.
3) Biltris: Ann. Inst. Pasteur 3, 1929.
4) Blumenthal u. v. Mallinckrodt-Haupt: Dermat. Z. 35, 1922; Arch. f. Dermat. 144, 1923.
5) Bodin u. Carriér: Bull. Soc. franc. Dermat. 36, 5, 1929.
6) Bukatsch: zit. n. Stepp, Kühnau u. Schroeder.
7) Butkerwitsch: Jahresb. wiss. Bot. 38, 1903.
8) Capelli: Dermosifilogr. 13, 1938.
9) Cerutti: Giorn. ital. Dermat. 77, 1936. — Pathologica (Genova) 25, 1933. — Boll. Sez. region. Soc. ital. Dermat. 3, 1934.
10) Dernby: Biochem. Z. 126, 1921/22.
11) Euler: Zs. phys. Chemie 137, 1924.
12) Flarer: Boll. Soc. ital. Biol. sper. 6, 1931.
13) Giroud, Leblond, Ratsimamanga u. Rabinowitz: Bull. franc. Dermat. 42, 1935.
14) Goddard: I. inf. Dis. 54, 1934.
15) Guha: Nature, (Lond.) I, 1937.
16) Gundersen: Dermat. Z. 82, 2, 1926; Arch. f. Dermat. 151, 1931.
17) v. Hahn und Junker: Jb. Kinderheilk. 121, 1928.
18) Jadassohn und Schaaf: Kli. Wo. I, 1934.
19) Joyeux und Sautet: Bull. Soc. franc. Dermat. 45, 6, 1938.
20) Kadisch: Dermat. Z. 55, 1929. Arch. f. Dermat. 162, 1930, 168, 1933.

21) Keller: Derm. Wo. 87, 48, 1928.
22) Kocsard: Giorn. ital. Dermat. 79, 1938.
23) Lieske: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Bornträger. Leipzig 1921).
24) v. Mallinckrodt-Haupt: Dermat. Z. 55, 1929; 64, 1932. — Zbl. Bakteriol. Abt. 1, Orig. 125, 1932. — Z. Parasitenkde. 5, 1933. — Z. Vitaminforschg. 7, 1938.
25) v. Mallinckrodt-Haupt u. Carrié: Dermat. Z. 69, 1934; Arch. J. Dermat. 169, 1934.
26) Manca Pastorino: Boll. Ist.sieroter., Milan 11, 1932.
27) Marchionini: Arch. f. Dermat. 158, 1929.
28) Mu, Frazier und Pillat: Chin. J. Physiol. 11, 1937.
29) Näslund und Dernby: Biochem. Zs. 138, 1923.
30) Nord, Dammann und Hofstetter, Naturwiss. 24, 297, 1936; 25, 652, 1937.
31) Oyama: Nagasaki Igakkwai Zassi 15, 1937.
32) Pintetti: Giorn. ital. Dermat. 83, 1942.
33) Rivalier und Boutelier: Bull. Soc. franc. Dermat. 5, 1929.
34) Scolari: Giorn. ital. Dermat. 72, 1931.
35) Schopfer-Jung, Meiklejohn, Morell: zit. n. Stepp, Kühnau und Schroeder.
36) Schroeder und Einhauser: Münch. med. Wo. II, 1936.
37) Stepp, Kühnau und Schroeder: Die Vitamine, Enke-Suttgart, 1939.
38) v. Szent-Györgyi: Dtsch. Med. Wo. 1937.
39) Talice: Ann. de Parasitol. 8, 1930.
40) Takenouchi: Jap. J. of Dermat. 27, 1927. — Jap. J. of Bot. 27, 9.
41) Takenvuti: Jap. J. of Dermat. 47, 1940.
42) Tatum; Knight, Schopfer: zit. nach Stepp, Kühnau und Schroeder.
43) Tenchio: Kli. Wo. II, 1934.
44) Truffi und Benetazzo: Boll. Scz. region Soc. ital. Dermat. 3, 1934.
45) Vamos: Orv. Hetil. I, 1931. — Dermat. Z. 63, 1932.
46) Williams: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 31, 1934. — Arch. of Dermat. 32, 1935; 38, 1938.

Index Nominum Mycetum

Acetobacter 55.
Achorion 201.
— gallinae 220.
— gypseum 134, 203, 220
— quinqueanum 28, 141, 162, 394.
— Schoenleini 28, 141, 172, 220, 224, 394.
— violaceum 220, 222.
Actinobacillus 62, 68.
Actinobacterium 63, 68
Actinomyces 18, 19, 60, 68, 398.
— albus 26, 76, 328.
— avadi 82.
— Bostroemi 76.
— bovis 66, 75.
— carneus 78.
— coralinus 328.
— griseus 26.
— hominis 75, 81.
— innominatus 81.
— Israeli 327.
— luteo-roseus 82.
— madurae 78.
— melanosporeus 80.
— rhodnii 328.
— sulfureus 78.
— termophylus 82.
— thuilieri 2.
— viridis 80.
Actinomycetaceae 62.
Actinomycetales 68.
Actinomycoides 63.
— actinoides 63.
Aerobasidium pullulans 33, 41, 44.
Aerothrix 62.
Allantospora 41.
Allescheria Boydi 43
Allonema 138.
Alternaria 10, 11, 12, 14, 15, 23.
— tenuis 12.
Ascoidea Rubescens 27.
Ashbya 126.
Aspergillus 10, 12, 23
— fumigatus 10, 11, 104.
— glaucus 45.
— nautae 105.
— nidulans 104, 388.
— nidulans var. Cesarii 104.
— nidulans var. nautae 108.
— nidulans var. Nicollei 104.
— niger 12.
Asporomyces uvae 269.
Astelosaccharomyces pseudotropicalis 37.

Blastodendrion 29, 36, 38.
— Flareri 39.
— intermedium 38.
— Krausi 38.
— procerum 37.
Blastomyces dermatitidis 281, 356, 362.
— brasiliensis 281.
Blastosporion 56.
Brettanomyces 243, 248.
— bruxellensis 248.
— italicus 248.
Brevistreptothrix 62.

Candida 208, 243, 330, 349.
— albicans 188, 273, 279, 330, 349.
— Brumpti 39.
— deformans 38.
— Flareri 39.
— Guilliermondi 127, 330.
— Krusei 330.
— lipolytica 330.
— monosa 255.
— mortifera 37.
— olei 256.
— parapsilosis 330.
— pseudotropicalis 37.
— pulcherrima 248, 268.
— tropicalis 330.
— zeylanoides 330, 340.
Castellania kartulisi 38.
— pseudotropicalis 37.
Catenaria 315.
Cephalosporium 34, 40, 41.
Chaetonium 11.
Chytridiales 315.
Cladosporium 10, 12, 14, 15, 23, 380.
— fulvum 14.
Cladothrix 60.
Coccidiaceae 27.
Coccidioides 27.
— immitis 8, 43, 315, 321, 375.
Coccidium Seeberia 342.
Coniosporium 10.
— corticolae 13.
Coniotricum 138.
Cohnistreptothrix 62, 68.
Corynemonas 62.
Cryptococcus 4, 16, 140.
— Coppelli 39.
— glutinis 247.
— Kartulisi 37.
— Krausi 38.
— **Mirandei** 39.
— meleagris 34.
— pararoseus 394.
— sulphureus 37.
— uvae 247.
Ctenomyces mentagrophytes 219.
Cystidiella valdensis 41.

Debaryomyces 244, 261.
— cavensis 263.
— globosus 261.
— Guilliermondi 127, 261.
— membranaefaciens 261.
— nicotianae 261, 265.
— nicotianae var. minor 262.

— marylandii 262.
— Matruchoti 262.
— tyrocola 261.
Dematium pullulans 41.
Dermocystidium pusula 26.
Dermosporidium 342.
— hylarum 342.
Dipodascus 27.
Discomyces 61.

Endoconidium 138.
Endogone 315.
Endomyces 16.
— fibuliger 126.
— javanensis 126.
— Hordei 126.
— Lindneri 126.
— pseudotropicalis 37.
Epidermophyton 6, 8, 140, 201.
— floccosum 219, 280.
— inguinale 220, 224, 394.
— interdigitale 16.
— Kauffmann-Wolf 394.
— rubrum 134, 220.
Eremascus Fertilis 126.
Erysipelothrix 62, 68.

Fonsecaea 381.
Fusarium 44.
Fusiformis 63, 68.

Geotrichoides 56.
— rosacea 44.
Geotrichum 41, 55, 138.
— candidum 34, 38, 40, 41, 187.
— lactis 55.
— mycoderma 55.
— suaveolens 38.
Glenospora Boydi 43.
— brevis 43.
— Clapieri 43, 384.
— Gammeli 43.
— gaudavensis 43.
— Graphii 43.
— Khartoumensis 43, 388.
— lanuginosa 43.
— meteuropea 43.
— Semoni 43, 388.
— viridobrunnea 41, 43.
Glenosporella Loboi 356, 360.
Gimnoascus 203.
Guilliermondella 127.
Guilliermondia 127.

Hansenia apiculata 247.
Hanseniaspora Guilliermondi 127.
Hansenula 243, 246.
— anomala 246.
— anomala var. spherica 246.
— Castellii 252.
— javanica 30, 31.
Helminthosporium 12, 23.
Hemispora stellata 138.
Histoplasma capsulatum 31, 32, 281.
— farcinimosum 19.
Hormodendron 44.
Hormodendrum 12, 380.
— pedrosoi 20.

Kloeckera 244, 247.
— apiculata 247.
— brevis 247.
— magna 247.
Kloeckeraspora 244, 247.
— uvarum 247.

Lactomyces inflans Caseigrana 37.
Leptothrichia 62, 68.
Leptothrichioideae 68.
Leptothrix 61.

Madurella 43, 384.
— americana 384.
— bovoi 388.
— grisea 384.
— Ikedae 384.
— Lackawanna 388.
— mycetomi 387.
—Oswaldoi 388.
— Ramiroi 388.
— tabackae 387.
— tozeuri 387.
Malbranchea 318.
Malleomyces 68.
Micromonospora 63, 68.
Monosporium sclerotiale 384, 388.
Microsporon 6, 139, 201.
— Auduini 145, 204.
— depauperatum 396.
— lanosum 141, 162, 172, 224.
Microsporum canis 222.
— felineum 172.
— fulvum 224.
Monilia 12, 16, 23.
— albicans 4, 273.
— geophila 12.
— intestinalis 39.
— londinensis 39.
— negri 39.
— pseudotropicalis 37.
— sitophila 12.
— tropicalis 20.
Mucor 10, 23.
Myceloblastanon pseudotropicale 37.
Mycobacteriaceae 18, 68.
Mycocandida 31.
— mortifera 37.
Mycoderma 54, 55, 244.
— aceti 55.
— cerevisiae 55, 188.
— decolorans 54.
— glutinis-farinulae 54, 55.
— lactis-butyrri 55.
— lagenae 55.
— malti-cerevisiae 55.
— malti-juniperini 55.
— mesentericum 55.
— multifermentans 56.
— nobile 56.
— ollare 55.
— Pasteurianus 55.
— pergameneum 55.
— subtile 56.
— sulphureus 37.
— tannica 54.
— vini 55.

Mycokluyveria 54, 57, 244.
— acidificans 57, 248.
— cerevisiae 57, 58, 248.
— decolorans 57, 58, 248.
— duplex 57, 248.
— glutinis-farinulae 57, 58.
— Lafari 57, 58, 248.
— tannica 57, 58.
— tenax 57, 248.
— valida 57, 58, 248.
— vini 57, 58, 248.
Mycomonas 62.
Mycotorula 31, 248.
— albicans 20, 34, 39.
— Chalmersi 38, 41.
— deformans 38.
— Guilliermondi 34, 37, 40, 41.
— Kephir 35, 36.
— Krausi 38.
— intermedia 248.
— lactosa 36, 37.
— lambica 31.
— messanensis 38, 40.
— mucinosa 40.
— trimorpha 34.
— tropicalis 37.
— vini 248.
— zeylanoides 32, 33, 38, 40.
Mycotoruleae 207.
Mycotoruloideae 207.
Mycotoruloides 31.

Nadsonia 127.
Nocardiaceae 62.
Nocardia 60.
— asteroides 108.
— lutea 394.
— rivierei 82.

Oidium lactis 55.
Oospora 60.
— nicotianae 263.
— nivea 44.
— tozeuri 387.

Paracoccidioides Brasiliensis 356, 363.
— cerebriformis 356, 361, 363.
— tenuis 364.
Parendomyces Broqui 9.
— Krausi 38.
Penicillium 10, 12, 14, 23, 335.
— chloroleucon 213.
— digitatum 12, 44.
— expansum 12.
— glaucum 10, 44.
Pericystis 26, 27.
— alvei 26, 27.
— apis 26, 27.
Pfeiferella 63, 68.
Phialoconidiophora Guggenheimia 379.
Phialophora 379.
— compactum 379.
— Jeanselmei 380, 384.
— Pedrosoi 379.
— verrucosa 379.
Phoma 23.
— conidiogena 10, 15.
Phycomyces Blakesleeanus 328.
Pichia 244, 246.
— alcoolophila 247.
— chiantigiana 247.
— Chodati var. Trumpyi 247.
— Derossii 247.
— membranaefacens 247.
— membranaefacens var. acidificans 247.
— uvarum 247.
Pionnothrix 62.
Pityrosporon 1.
— ovale 1.
Poecylomyces varietii 11.
Proactinomyces 63, 68, 82.
— asteroides 82.
— asteroides var. crateriforme 82.
— asteroides var. decolor 82.
— asteroides var. gypsoides 82.
Pseudococcidioides Mazzoi 377.
Pseudomonilia deformans 38.
Pseudomycoderma Mazzae 38.
Pseudosaccharomyces apiculatus 247.
— magnus 247.
Pullularia pullulans 41.
Puccinia 23.
— graminis 10, 13.

Rhinosporidium 27, 342.
— amazzonicum 342.
— ayyari 342.
— equi 342.
— kinealyi 342.
— Seeberi 343.
Rhizomonas 62.
Rhodotorula 187, 243, 247, 263, 335.
— glutinis 247.
— mucilaginosa 264.
— mucilaginosa var. kentuckyi 264.
— mucilaginosa var. Scafatii 264.
— polimorpha 264.
Rhizopus 10.
— nigricans 12.

Sabouraudites Auduini 219.
Saccharomyces 126, 244.
— acetaethylicus 246.
— anomalus 246.
— apulicus 245, 247.
— Bayanus 245.
— bacillaris 247.
— Carlsbergensis var. Mandshuricus 245.
— Carlsbergensis var. Valdensis 245.
— cerevisiae 11, 28, 29, 187, 245, 265.
— cerevisiae var. ellipsoideus 245.
— cerevisiae var. festinans 245.
— cerevisiae var. major 245.
— cerevisiae var. umbra 245.
— Chevalieri var. torulosis 244.
— Chodati 30, 244.
— conglomeratus 246.
— ellipsoideus 187, 188, 245, 265.
— ellipsoideus var. major 245.
— exiguus 244.
— festinans 245.
— glutinis 247.
— Guilliermondi 127.
— Kephir 36
— italicus 244.
— lactis 37.

— mandshuricus 245.
— Mangini 269.
— Mangini var. casei 269.
— Mangini var. tetrasporus 245.
— Marxianus 246.
— nicotianae 260.
— olei 259.
— oviformis 245.
— oviformis var. bisporus 245.
— pastorianus 245.
— Rouxi 252.
— sphericus 246.
— stellatus 247.
— tetrasporus 245.
— torulosus 244.
— uvarum 245.
— Valdensis 245.
Sachsia suaveolens 38.
Saccharomycodes 244.
— Ludvigi 245.
Saccharomycopsis capsularis 126.
Schizosaccharomyces 243, 245.
— hominis 2, 8, 9.
— liquefaciens 245.
— octosporus 245.
— Pombe 245.
Sclerotinia sclerotiorum 34.
Scopulariopsis d'Agatae 138.
Sporendonema epizoum 44, 137
Sporobolomyces 33, 126.
— salmonicolor 32.
— shibatanus 32.
Sporotrichum 222, 370, 398.
— Beurmanni 370.
— Schencki 370.
Streptothrix 60.
— chalceae 65.
— coelicolor 394.
— Foersteri 62, 74.
— madurae 82.
Synascomycetaceae 27.

Tilletia 23.
— laevis 10.
Torula 334.
— epizoa 137.
— glutinis 247.
— Jeanselmei 380.
— Kephir 36.
— lactis 37.
— lactophyla 37.
— lactosa 36.
— morrhuae 137.
— rubiginosa 137.
— sacchari 137.
— spumosa 37.
Torulaspora 244, 246.
— rosei 187, 246.
Torulopsis 243, 244, 247, 330, 335, 340.
— albida 33, 247.
— bacillaris 247.
— candida 33, 41, 44, 188.
— colliculosa 29.
— carnescens 247.
— flavescens 33, 34.
— holmi 249.
— Kephir 36.
— minor 33.
— molischiana 253.
— oleifabricae 254.
— pulcherrima 331.
— sexta 29.
— stellata 254.
— uvae 247.
Torulopsidaceae 207.
Torulopsideae 207.
Trichoderma 10, 12, 23.
— Koeningi 12.
Trichophyton 4, 134, 139, 201.
— cerebriforme 224.
— crateriforme 134.
— discoides 328.
— fumatum 224.
— gypseum 280, 394.
— gypseum asteroides 141, 162, 220, 224.
— interdigitale 224.
— lacticolor 222.
— plicatile 224.
— radians 222.
— rosaceum 27, 224.
— rubrum 279.
— Schoenleini 204, 219.
— tonsurans 219, 220.
— violaceum 219, 222, 224.
Trichosporon 56, 250.
— beigeli 40.
— cutaneum 40.
— fermentans 250.
— Gammeli var. lanuginosum 43.
— geotrichoides 56.
— infestans 40.
— Luchettii 40.
— proteolyticum 316, 375.
— proteomyces 56.
Trichotecium roseum 10, 44.

Ustilago 23.
— zeae 10.

Willia anomala 246.
— Trumpyi 247.

Zygosaccharomyces 126, 244, 246.
— ameboideus 246, 269.
— Bailii 269.
— conglomeratus 246.
— felsineus 246.
— florentinus 246.
— globiformis 246.
— gracilis 246.
— gracilis var. italicus 246.
— Marxianus 246.
— mongolicus 250.
— polymorphus 246.
— polymorphus var. ameboideus 246.
— polymorphus var. variabilis 246.
— priorianus 246.
— vini 246.
Zygosaccharomycodes Guilliermondi 127.